

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DU PIGMENT PALUDIQUE, L'HÉMOZOÏNE, SUR LE STATUT REDOX
ET LA PRODUCTION DES INTERLEUKINES-10 ET -12 PAR LES MACROPHAGES
DÉRIVÉS DE LA MOELLE OSSEUSE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
STÉFANY BAZINET

JANVIER 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dr Tatiana Scorza, pour son soutien et son encadrement tout au long de mon séjour au sein de son laboratoire. Je tiens à la remercier d'avoir toujours su trouver le temps de me conseiller, d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé durant tout ce parcours.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr Martin Olivier pour l'hémozoïne synthétique ainsi que les inhibiteurs qu'il nous a si généreusement fournis.

Je souhaite également remercier mes collègues de laboratoire : Benoît Bélanger, Mathieu Cambos et Jorge Cueva Vargas pour leur amitié, leur compagnie ainsi que leurs nombreux conseils. Un merci particulier également aux stagiaires ayant participé au développement de mon projet de maîtrise : Manon Richaud ainsi que Audrey Chole.

Je voudrais par le fait même remercier M. Luc Dubé ainsi que Mme Marie-Josée Carbonneau, techniciens de laboratoires à l'UQAM, pour les nombreux conseils, les rires ainsi que pour leur soutien moral et technique.

J'aimerais finalement remercier ma famille, tout particulièrement ma mère ainsi que mon conjoint pour leurs encouragements tout au long de ma maîtrise et particulièrement au moment de la rédaction de ce mémoire. Je les remercie également pour leur amour, leur patience ainsi que pour le temps passé à mes côtés.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Réponse immunitaire adaptatrice.....	3
1.2 Macrophages activés par la voie alternative	4
1.3 Le Glutathion (GSH)	5
1.4 Espèces réactives de l'oxygène (EROs)	6
1.5 L'interleukine-12 (IL-12)	7
1.5.1 Mécanisme d'induction de l'IL-12	7
1.5.2 Effet d'agents thiolés sur la production d'IL-12.....	8
1.6 Hème oxygénase-1 (HO-1).....	8
1.7 La voie de la p38 MAPK	9
1.8 NFκB.....	10
1.9 Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	11
1.10 Stress oxydatif et malaria.....	12
1.11 Hémozoïne.....	15
1.12 Antioxydants et malaria.....	16
1.13 Objectifs.....	18
CHAPITRE II	
DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE	19
2.1 Isolation et préparation des macrophages.	19
2.2 Traitement <i>in vitro</i>	19
2.3 Traitement avec inhibiteurs.	19
2.4 Induction et évaluation des réponses d'IL-12.	20
2.5 Évaluation des EROs.	20
2.6 Détermination des niveaux intracellulaires de GSH.	20
2.7 Activité métabolique.....	21
2.8 Analyses statistiques.....	21

CHAPITRE III

ARTICLE : Hemozoin and Hemin inhibit IL-12p70 responses through an IL-10/p38 MAPK-independent mechanism that may involve upregulation of reduced glutathione.....22

3.1	Abstract.....	22
3.2	Introduction.....	23
3.3	Material and Methods.....	25
3.4	Results.....	28
3.5	Discussion.....	32

CHAPITRE IV

RÉSULTATS43

4.1	Comparaison de l'effet de l'HZ et de l'agent oxydant DEM sur la fonction des BMMps murins.	43
4.1.1	Effet du DEM sur le GSH intracellulaire des BMMps.....	43
4.1.2	Le DEM n'est pas un fort inducteur de la production d'EROs chez les BMMps murins.	45
4.1.3	Le DEM et l'HZ synthétique inhibent la production d'IL-12p70 chez les BMMps suite à une stimulation par IFN γ et LPS de manière IL-10 indépendante.	46
4.1.4	Restauration de la production d'IL-12p70 par le NAC chez les BMMps prétraités avec du DEM.....	47
4.2	Effet de l'ajout d'inhibiteurs de voies de signalisation impliquées dans la production d'IL-12 sur la fonction des BMMps.....	48
4.2.1	Effet d'un inhibiteur de la voie de NF κ B sur la production de cytokines par les BMMps suite à une stimulation par LPS ou par IFN γ /LPS.....	48
4.2.2	Effet d'un inhibiteur de la voie de JNK sur la production de cytokines par les BMMps (prétraités avec de l'HZ) suite à une stimulation par LPS ou par IFN γ /LPS.	50
4.2.3	Effet d'un inhibiteur de la voie de ERK sur la production de cytokines par les BMMps (prétraités avec de l'HZ) suite à une stimulation par LPS ou par IFN γ /LPS.	52
4.2.4	Effet d'un inhibiteur de la voie de la p38 MAPK sur la production de cytokines par les BMMps (prétraités ou non avec de l'HZ ou du DEM) suite à une stimulation par LPS ou par IFN γ /LPS.....	54

CHAPITRE V

DISCUSSION56

OUVERTURE SUR LE PROJET60

BIBLIOGRAPHIE	61
---------------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Cycle de vie de <i>Plasmodium</i> chez ses deux hôtes : l'homme et le moustique <i>Anophèle</i> femelle.....	11
Figure 3.1: A. Level of ROS production in BMMps induced by HZ or HE. B. HO-1 expression induced by HZ or HE. C. GSH/GSSG ratio in BMMps following treatment with NAC, DEM, HZ, HE or a combination of the above. D. GSH/GSSG ratio in BMMps following treatment with HZ, HE, IFN γ or a combination of HZ/HE and IFN γ	35
Figure 3.2: Inhibition of IL-12p40 and IL-12p70 production by HZ and HE in BMMps.....	36
Figure 3.3: IL-10 production by HZ or HE-conditioned BMMps.....	37
Figure 3.4: Impact of IL-10 neutralization on IL-12 responses.....	38
Figure 3.5: Inhibition of IL-12 production by HZ and HE is refractory to treatment with NAC.....	39
Figure 3.6: Effect of a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580) on the IL-12 responses.....	40
Figure 3.7: Effect of a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580) on the IL-10 response.....	41
Figure 3.8: IL-12p40 and IL-12p70 inhibition in response to a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580).....	42
Figure 4.1: Niveaux de glutathion A) total, B) réduit, C) oxydé et D) ratio GSH/GSSG de lysats cellulaires de BMMps murins suite à un traitement par du NAC ou du DEM.....	44
Figure 4.2: Production d'EROs par les BMMps murins suite à un traitement avec des agents oxydants.....	45
Figure 4.3: Production A) d'IL-12p70 et B) d'IL-10 par des BMMps prétraités avec de l'HZ (25 μ g/mL) pendant 24 heures ou par du DEM (25 μ M) pendant 4 heures, suite à une stimulation par LPS (50ng/mL) et IFN γ (50U/mL) de 24 heures.....	46
Figure 4.4: Effet d'une stimulation par IFN γ /LPS en présence ou absence de NAC sur la production d'IL-12p70 par des BMMps prétraités avec du DEM.....	47
Figure 4.5: Effet d'un inhibiteur de NF κ B (CAPE) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 par des BMMps murins.....	49
Figure 4.6: Effet d'un inhibiteur de JNK (SP600125) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 par des BMMps murins.....	51
Figure 4.7: Effet d'un inhibiteur de la MAPK ERK (Apigénine) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 par des BMMps murins.....	53
Figure 4.8: Effet d'un inhibiteur de la p38 MAPK (SB203580) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 chez des BMMps murins prétraités ou non par de l'HZ ou du DEM.....	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degré Celcius

% : pourcent

ADN : acide désoxyribonucléique

AMP : adénosine monophosphate

ARNm : acide ribonucléique messenger

BMMps : macrophages dérivés de la moelle osseuse (bone-marrow macrophages)

CD : cellule dendritique

CD4 : cluster of differentiation 4

CD28 : cluster of differentiation 28

CD40L: ligand du «cluster of differentiation 40»

CMH-1: complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CO : monoxyde de carbone

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CRF : composé riche en fer

CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

DEM : diéthyl maléate

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DTNB : 5,5'-Dithio-Bis(2-Nitrobenzoic Acid) ou réactif de Ellman

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ERK : kinase régulée par un signal extracellulaire (extracellular signal-regulated kinase)

EROs : espèces réactives de l'oxygène

FBS : sérum de boeuf fœtal (fetal beef sera)

FCS : sérum de veau fœtal (fetal calf sera)

GR : globule rouge

GRp : globule rouge parasité

GSH : glutathion

GSH-OEt : glutathion éthyl-ester

GSSG : glutathion oxydé

h : heure

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H₂-DCFDA : 2,7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate acétyl ester

Hb : hémoglobine

HE : hémine

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HO-1 : hème oxygénase-1

HRP : horseradish peroxidase

HSP : protéine de choc thermique (heat shock protein)

HZ : hémozoïne

IFN γ : Interféron-gamma

IgG : immunoglobuline G

I κ B : inhibiteur de NF κ B

JNK : kinase du N $^{\text{H}}$ 2-terminal de c-Jun

kDa: kilodalton

IL : interleukine

IL-10 $^{-/-}$: déficient en IL-10

LPS : lipopolysaccharide

mAb : anticorps monoclonal

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes (mitogen activated protein kinase)

M-CSF : facteur de croissance de colonie de macrophage (macrophage colony stimulating factor)

MES : acide 2-(N-morpholino)éthanesulphonique

MKK3: protéine kinase kinase 3 activée par les mitogènes (Mitogen-activated protein kinase kinase 3)

mM : millimolaire

Mp : macrophage

MPA : acide métaphosphorique (metaphosphoric acid)

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

NAC : N-Acétyl cystéine

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF κ B : facteur de transcription nucléaire kappa B (nuclear factor kappa B)

NaOH : hydroxyde de sodium

NK : Natural Killer

nm : nanomètre

NO : oxyde nitrique

OD : densité optique (optical density)

p38 MAPK: protéine kinase p38 activée par les mitogènes (p38 mitogen activated protein kinase)

PBMC : cellules sanguines mononucléaires périphériques (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS : tampon phosphate salin (Phosphate Buffer Saline)

PBS-T : tampon phosphate salin-Tween (Phosphate buffer salin-Tween)

P. c. adami : *Plasmodium chabaudi adami*

PCR : réaction de polymérase en chaîne (polymerase chain reaction)

PDTC : pyrrolidine dithiocarbamate

P. falciparum : *Plasmodium falciparum*

pH : potentiel hydrogène

pMps : macrophages péritonéaux

PMS : phenazine methosulfate

P/S : pénicilline/streptomycine

RcT : récepteur de cellule T

ROS : reactive oxygen species

RPMI-1640 : Roswell Park Memorial Institute-1640

SAPK : protéine kinase activée par le stress (stress-activated protein kinase)

SB203580 : 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinyl phenyl)-5-(4-pyridyl) 1H-imidazole

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEM : erreur type de la moyenne (standard error of the mean)

SOD : superoxyde dismutase

TEAM : triéthanolamine

T_H1 : T auxiliaire 1 (cellule ou réponse T_H1)

T_H2 : T auxiliaire 2 (cellule ou réponse T_H2)

TNF- α : facteur de nécrose tumorale-alpha (tumor necrosis factor-alpha)

TNF- β : facteur de nécrose tumorale-beta (tumor necrosis factor-beta)

TRX: thioredoxine

U: Unités (Units)

μ g : microgramme

μ L: microlitre

V: Volt

RÉSUMÉ

La production défectueuse d'IL-12, associée à l'anémie et dysérythropoïèse durant la malaria, semble être causée par le pigment paludique hémotoïne (HZ). Ce dernier inhibe l'expression génique de l'IL-12p40 dans les monocytes humains par un mécanisme dépendant de l'IL-10. Étant donné que plusieurs études ont associé les effets anti-inflammatoires de l'HZ au stress oxydatif et que les oxydants inhibent l'IL-12 par un mécanisme dépendant des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et de l'induction de la hème oxygénase-1 (HO-1), nous avons étudié les effets de l'HZ synthétique et de l'hémine (HE) sur la production des EROs et l'induction de la HO-1 dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMMps). De manière intéressante, le stress oxydatif dépendant du fer mène à l'induction de la HO-1 via une voie dépendante de la p38 MAP kinase. Puisque cette enzyme semble essentielle pour les effets anti-inflammatoires de l'IL-10, les effets de l'HZ synthétique et de l'HE sur la production de cette cytokine dans les BMMps ont été étudiés. De plus, la production d'IL-12p40 et d'IL-12p70 en réponse à une stimulation par LPS ou IFN γ /LPS a été comparée, de même que l'effet du n-Acétylecystéine (NAC) exogène sur ces réponses. Également, l'effet d'inhibiteurs des voies de signalisation en réponse au LPS ou IFN γ /LPS chez des BMMps a été évalué au niveau des réponses d'IL-12p70 et d'IL-10. En contraste à l'HZ, l'HE a été démontré comme étant un fort inducteur de la HO-1 et des EROs. Aucun de ces deux composés riches en fer (CRFs) n'induisait davantage la production d'IL-10 en réponse au LPS, mais ces deux composés diminuaient significativement la production d'IL-12p70 et d'IL-12p40 par les BMMps stimulés avec du LPS ou IFN γ /LPS. De manière intéressante, l'inhibition de la p38 MAP kinase a mené à une chute significative de la production d'IL-10 et à une sécrétion augmentée d'IL-12p70 dans les BMMps témoins et prétraités avec de l'HZ, mais a échoué à restaurer la réponse déficiente d'IL-12p70 en réponse à l'IFN γ et au LPS dans les BMMps traités par HZ et HE. Les effets inhibiteurs de l'HZ et de l'HE sur la production d'IL-12p70 étaient réfractaires au traitement par le NAC. La principale voie impliquant une différence de comportement des BMMps en réponse à l'HZ semble être celle de la MAPK JNK puisqu'un inhibiteur de celle-ci semble contrer au moins partiellement l'effet inhibiteur de l'HZ sur la production d'IL-12p70. Nos résultats suggèrent donc que l'HZ inhibe la production d'IL-12p70 dans les BMMps murins via un mécanisme indépendant de la voie de la p38 MAP kinase et de l'IL-10 mais qui pourrait dépendre d'une augmentation des niveaux de GSH intracellulaires.

MOTS CLÉS : malaria, stress oxydatif, hémotoïne, Interleukine-12, Interleukine-10

INTRODUCTION

La malaria est causée par un parasite du genre *Plasmodium* (Ekvall, 2003; Lamb et al., 2006; Omodeo-Sale et al., 2003) et est la cause de 2 à 3 millions de décès annuellement (Moorthy et al., 2004; Wykes et Good, 2007). Durant les infections par *Plasmodium*, tant chez l'homme que chez les modèles expérimentaux, un fort stress oxydatif a été décrit et associé en partie au métabolisme de l'hémoglobine (Hb) et à la libération de fer (Becker et al., 2004; Schwarzer et al., 2003). En effet, au cours de ces infections, l'érythrophagocytose de globules rouges (GRs) (riche en fer de par le noyau ferrique de l'hème de l'Hb) et de globules rouges parasités (GRp) est fortement stimulée, tout comme la phagocytose de l'HZ libre par les neutrophiles, les monocytes ainsi que les macrophages (Mps) (Schwarzer et al., 2003; Schwarzer et al., 1996). Le pigment paludique, connu sous le nom d'hémozoïne (HZ), est un polymère insoluble de l'hème, produit par le parasite suite à la dégradation de l'Hb des GRs de l'hôte. N'étant pas métabolisé par les cellules phagocytaires, l'HZ s'accumule à l'intérieur de celles-ci et inhibe leurs fonctions cellulaires accessoires normales, telles la phagocytose ainsi que la flambée respiratoire par un mécanisme dépendant du stress oxydatif (Schwarzer et al., 2008). En effet, nous avons observé une forte production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) par les Mps péritonéaux (pMps) murins suite à une infection par une espèce de *Plasmodium* infectant le rongeur : *Plasmodium chabaudi adami*.

L'immunité protectrice contre la malaria est conférée entre autres par une cascade d'événements impliquant la production d'IL-12 (révisé par Luty et al., 2000). En effet, les souris déficientes en IL-12 ne peuvent résoudre cette infection et l'administration d'IL-12 recombinant leur permettrait de la contrôler (Stevenson et al., 2001; Stevenson et al., 1995; Su et Stevenson, 2000, 2002). Dans ce contexte, les infections par *Plasmodium* ont été associées à une inhibition des réponses d'IL-12p40 et d'IL-12p70 (Boutlis et al., 2003; Luty et al., 2000; Xu et al., 2001). Il a été suggéré que cette inhibition permettrait la survie des parasites tels qu'il en est le cas pour le lypophosphoglycan de *Leishmania* (Feng et al., 1999).

L'accumulation d'HZ a été associée à une inhibition des réponses d'IL-12 (p40 et p70). L'HZ semble activer la voie de la MAPK (protéines kinases activées par les mitogènes) ERK (kinase régulée par un signal extracellulaire) (Jaramillo et al., 2005), qui est un régulateur négatif de la production d'IL-12, mais jusqu'à présent, son impact sur les voies de signalisation impliquées dans la production d'IL-12 et induites par le lipopolysaccharides (LPS) et l'interféron (IFN) γ n'est pas connu.

Par ce projet d'étude, nous tenions à comparer l'effet de deux composés riches en fer (CRFs), l'HZ et l'hémine (HE), au niveau des réponses d'IL-12p70, d'IL-12p40 et d'IL-10 suite à une stimulation par LPS ou IFN γ /LPS afin de déterminer si la suppression de l'IL-12 par l'HZ n'était conférée que par sa nature ferrique ou si d'autres facteurs étaient impliqués, telle l'IL-10 qui est son principal inhibiteur physiologique (Rahim et al., 2005). Ainsi, puisque l'HZ semble inhiber certaines cytokines par le stress oxydatif (Taramelli et al., 2000) et qu'elle semble induire l'IL-10 (Keller et al., 2006), indiquée en effet comme la cause de l'inhibition de l'IL-12 (Aste-Amezaga et al., 1998; Keller et al., 2006), nous cherchions à vérifier s'il était possible qu'elle agisse en tant qu'oxydant. La comparaison avec l'HE semblait donc intéressante parce que l'HE est un oxydant «biologique» également libéré dans la circulation durant les infections de la malaria et stimule la hème oxygénase-1 (HO-1), qui est une enzyme anti-inflammatoire impliquée dans la dégradation des CRFs.

Nous avons également comparé l'HZ au diéthyl maléate (DEM), un agent oxydant classique dépourvu de noyau ferrique. Nous voulions évaluer si, par l'ajout de composés réducteurs avant la stimulation, la réponse déficiente en IL-12 induite par l'HZ pouvait être restaurée puisqu'il a été suggéré que l'HZ inhibe la production de certaines cytokines par un mécanisme dépendant des EROs (Taramelli et al., 2000) et qu'il a été observé que suite à un traitement avec la superoxyde dismutase (SOD), la production d'EROs induite par l'HZ était bloquée (Jaramillo et al., 2005). De plus, nous avons comparé la réponse des BMMps (témoins versus traités avec de l'HZ ou de l'HE) aux inhibiteurs de différentes voies activées par le LPS et impliquées dans la production d'IL-12 afin d'établir si des comportements comparables étaient observés. Ainsi, cette technique d'approche nous a permis d'identifier quelques avenues pour déterminer les voies de signalisation activées ou inhibées par l'HZ, dans le contexte de son accumulation chez la cellule phagocytaire pour plus de 12 heures.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Réponse immunitaire adaptatrice

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) jouent un rôle important dans la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules effectrices du type 1 T_H1 (caractérisée par leur production d'IFN γ) ou du type 2 T_H2 (caractérisée par leur production d'IL-4). La voie T_H1 soutient l'immunité de type cellulaire, qui implique l'activation des Mps et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, au détriment de l'immunité de type humorale, caractérisée par l'activation de lymphocytes B et la production des anticorps. La différenciation fonctionnelle des cellules T CD4⁺ effectrices, qui a lieu dans les étapes précoces de leur activation, nécessite un premier signal, établi lorsque la cellule T reconnaît et interagit, via son Récepteur de cellule T (RcT), avec un complexe «antigène-molécule du complexe majeur d'histocompatibilité», présenté par la CPA (Kim et al., 2004; Kindt et al., 2006; Rincon et al., 2001). Ensuite, un deuxième signal de co-stimulation est requis pour une activation efficace, établie par l'interaction des molécules accessoires (B7-1 ou B7-2) exprimées par les CPAs, avec le CD28 ou le CTLA-4, fournis par les cellules T (Rincon et al., 2001). Lorsque ces deux signaux sont présents, la cellule T produit de l'IL-2, exprime le récepteur de l'IL-2 et prolifère (Kindt et al., 2006; Rincon et al., 2001). Si cette activation se produit au sein d'un environnement où l'IL-12 domine, il y a génération de cellules T_H1 sécrétant un profil de cytokines T_H1 incluant l'IFN γ . Une boucle positive de réaction est établie lors de la sécrétion d'IFN γ par la population de cellules T_H1 en expansion, ce qui stimule davantage les cellules dendritiques (CDs) et les Mps à produire de l'IL-12 (Kim et al., 2004) tout en inhibant l'expansion des cellules T_H2 (Kindt et al., 2006).

La subdivision en T_H1 et T_H2 se base principalement sur les types de cytokines sécrétées par les cellules T CD4⁺, suivant leur stimulation, qui dicteront ainsi leur fonction. Plusieurs facteurs, tel le stress oxydatif (Dobashi et al., 2001; Peterson et al., 1998), les cytokines produites au cours

de réactions antérieures de l'immunité innée ainsi que les cytokines produites par les CPAs régulent la nature de la réponse effectrice (Parham, 2003).

Chez les souris BALB/c, les infections non-virulentes par *Plasmodium chabaudi* se caractérisent par un changement d'une réponse type T_H1 vers une réponse de type T_H2 (Sponaas et al., 2006; Taylor-Robinson, 1995). La première prédomine au sein de la phase aiguë (précédant le pic d'infection) et sert à contrôler l'infection par l'activation des cellules NK (Natural Killer) et des Mps (Satoskar et al., 1999), et est suivie par une réponse de type T_H2 durant les phases tardives de l'infection, au moment où la parasitémie entre en rémission sous le contrôle des anticorps (Riley et al., 2006; Taylor-Robinson, 1995). Le profil de cytokines produites en ordre chronologique pendant l'infection a bien été caractérisé (IFN γ versus IL-4 et IL-10) mais les facteurs amenant à ces changements restent inconnus.

1.2 Macrophages activés par la voie alternative

Dépendamment des cytokines de l'environnement, les Mps se différencient en deux sous-ensembles, chacun possédant des rôles immunologiques spécifiques (Noel et al., 2004). Les Mps activés par la voie «classique», i-e par l'IFN γ , libèrent des produits microbiens et/ou inflammatoires suite à leur induction, qui est effectuée généralement au sein d'un environnement composé de cytokines de type T_H1 et via la présence de molécules microbiennes pro-inflammatoires (tel les LPS) (Noel et al., 2004). Ces Mps, dits «classiquement activés», sont inhibés par les cytokines de type T_H2 (Noel et al., 2004). Le deuxième sous-ensemble est représenté par des Mps activés par la voie alternative, contrôlée par l'IL-4, et qui stimulent plutôt la tolérance immunitaire ou le développement d'une réponse T_H2 (Noel et al., 2004). En effet, il en résulte une diminution de la flambée oxydative et une croissance persistante du pathogène (par exemple d'un parasite). Ainsi, il a été suggéré que les Mps activés par la voie alternative protègent les organes ainsi que les tissus avoisinants contre des réponses immunitaires dommageables et régulent à la baisse les réactions inflammatoires déclenchées par les Mps pro-inflammatoires (Loke et al., 2002; Noel et al., 2004).

1.3 Le Glutathion (GSH)

Le GSH est un tri-peptide abondant dans pratiquement toutes les cellules et il constitue la première ligne de défense cellulaire contre les blessures oxydatives (Kim et al., 2004; Murata et al., 2002b). De par sa capacité de liaison avec sa forme oxydée, le GSH représente un système tampon redox (Haddad et Harb, 2005) et agit simultanément avec la GSH peroxidase (GPx), en tant qu'antioxydant au sein de la détoxification de peroxydes hautement réactifs (Haddad et Harb, 2005).

La production de cytokines de type 1 est inhibée par une déplétion du GSH, et de même, une telle inhibition peut également favoriser les réponses de type T_H2 (Peterson et al., 1998). Ainsi, l'habileté à générer une réponse T_H1 ou T_H2 dépend indirectement du statut redox des Mps, ce qui détermine en aval le patron de la réponse (T_H1 ou T_H2) de la cellule T $CD4^+$ activée (Taylor-Robinson, 1995; Yamada et al., 2004). De plus, les déplétions sévères de GSH, représentant plus de 70% du GSH total, affectent l'habileté des CPAs à apprêter ainsi qu'à présenter l'antigène aux cellules T (Short et al., 1996), ceci étant principalement dû au fait que les ponts disulfures doivent nécessairement être réduits avant la digestion protéolytique de l'antigène (Allen et Unanue, 1984; Collins et al., 1991). La balance T_H1/T_H2 semble être régulée par le rapport entre les Mps réducteurs (ayant un contenu intracellulaire élevé de GSH) et les Mps oxydants (ayant un contenu faible en GSH) (Murata et al., 2002b).

Puisque la déplétion du GSH intracellulaire inhibe la production de cytokines de type T_H1 en favorisant les réponses de type T_H2 par l'inhibition d'IL-12 (cytokine de type 1 stimulatrice de la production d'IFN γ), il est probable que le stress oxydatif généré durant l'infection par *Plasmodium* soit impliqué dans le changement de la réponse T_H1 vers une réponse T_H2 , observée dans le modèle d'infection par *Plasmodium c. adami* (Sponaas et al., 2006). De plus, il a été démontré qu'une chute dans la production d'IFN γ , due à une déplétion du GSH des CPAs, est précédée par une diminution dans la production d'IL-12 (Peterson et al., 1998).

Les expériences de Gmünder et collaborateurs (1990) ont procuré la première évidence de la génération des cystéines par les Mps stimulés, qui influencent fortement la concentration du GSH intracellulaire des lymphocytes dans leur voisinage. Des expériences complémentaires ont démontré le fort pouvoir régulateur des cystéines extracellulaires et du taux intracellulaire de GSH sur les différentes fonctions des lymphocytes avoisinants (Gmünder et al., 1990). De plus, il a également été suggéré que les facteurs de transcription redox-sensibles induits en réponse au stress sont sous le contrôle du GSH (Droge et al., 1994; Hayes et McLellan, 1999).

1.4 Espèces réactives de l'oxygène (EROs)

Des EROs risquent d'être générées lors de réactions impliquant à la fois de l'oxygène bi-radicalaire et des systèmes réducteurs de transfert d'électrons. Ces molécules ont une fonction importante dans les réactions d'oxydoréduction, impliquées dans les cascades de signalisation cellulaire (Finkel, 2003). En effet, les EROs activent diverses voies de signalisation telle la voie de NFκB (facteur de transcription nucléaire kappa B), de JNK (kinase du N_H2-terminal de c-Jun) et de la p38 MAPK, et leur rôle est déterminant au cours de l'inflammation ainsi que dans la croissance, l'apoptose et la sénescence cellulaire (Barouki, 2006).

Suite à l'accumulation d'EROs au sein d'une cellule, des molécules de défense anti-oxydantes s'occupent de leur neutralisation afin d'éviter des dommages oxydatifs (Barouki, 2006). Ces molécules protectrices sont représentées par le GSH, les vitamines C et E, la bilirubine et des enzymes telles la catalase, les superoxydes dismutases (SOD), la GSH peroxydase et la thioredoxine (TRX) (Beckman et Ames, 1999; Morel et Barouki, 1998).

En face d'une accumulation persistante d'EROs, la cellule s'adapte en exprimant des enzymes anti-oxydantes, des protéines chaperonnes et des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN. À ce moment, nous parlons de stress oxydatif puisque la cellule a adapté sa physiologie en fonction des modifications de son environnement «oxydé». Ainsi, la présence de stress oxydatif est souvent révélée par l'induction des enzymes anti-oxydantes (telles les SOD) (Barouki, 2006). Puisque les EROs sont hautement réactives et difficilement détectables directement, la mesure du stress oxydatif est souvent analysée par la détection des modifications oxydatives induites par ces radicaux sur des molécules régulatrices de l'homéostasie redox telles que le GSH, ainsi que sur les SOD.

Les SOD catalysent la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'oxygène à partir de deux molécules de dioxygène radicalaire (Turrens, 2004). Étant toxique, le peroxyde doit être rapidement retiré et dans les cellules de mammifères, cette tâche est accomplie par deux familles d'enzymes : la GSH peroxydase et les catalases. Ces enzymes réduisent le peroxyde en eau et en oxygène; la GSH peroxydase utilise le pouvoir réducteur du GSH pour détoxifier le H₂O₂ (Nordberg et Arner, 2001). Les équivalents réducteurs nécessaires pour l'activité de la GSH peroxydase sont fournis par les groupements sulfhydriles des résidus cystéines. Dans la réduction du peroxyde d'hydrogène, deux molécules de GSH sont oxydées afin de former le composé oxydé GSSG. La GSH réductase utilise le NADPH afin de réduire à nouveau une molécule de GSSG en deux molécules de GSH, ce qui rend possible l'activité continue de la GSH peroxydase.

(Nordberg et Arner, 2001). En raison des rôles très importants des enzymes utilisant le GSH pour les fonctions normales, les cellules possèdent des concentrations de GSH en excès (Davies, 2000).

1.5 L'interleukine-12 (IL-12)

La production de l'IL-12 bioactive par les CPAs est une réponse complexe régulée par de multiples composants de signalisation incluant les cascades des MAP kinases, le NFκB, les molécules modulant l'AMP cyclique, les canaux et pompes ioniques de la membrane cellulaire, l'oxyde nitrique (NO) et les récepteurs internes et de surfaces cellulaires (Kang et al., 2005). La molécule bioactive d'IL-12 (p70) est un hétérodimère composé d'une sous-unité IL-12p35 et d'une sous-unité IL-12p40, les deux étant liées par un lien disulfure (Kobayashi et al., 1989; Stern et al., 1990). Certaines études suggèrent que ce lien disulfure n'est aucunement essentiel à l'association de l'hétérodimère et sert plutôt à le stabiliser, par l'interaction d'un résidu arginine de la sous-unité p35 et d'une pochette hydrophobe liant ce résidu arginine sur la sous-unité p40 (Yoon et al., 2000). La sous-unité IL-12p40 peut exister tant sous la forme de monomère IL-12p40, d'homodimère IL-12p40 que sous la forme d'hétérodimère IL-12p70. Sous la forme d'homodimère IL-12p40, elle peut servir d'antagoniste à la molécule bioactive IL-12p70 et ce, par compétition pour la liaison au récepteur d'IL-12 à la surface des cellules TH0 (Heinzel et al., 1997; Ling et al., 1995; Presky et al., 1998). On peut donc supposer qu'une très forte sécrétion d'IL-12p40 pourrait bloquer la voie de signalisation d'IL-12p70.

1.5.1 Mécanisme d'induction de l'IL-12

L'IL-12 est induite par deux mécanismes : le premier, déclenché par la reconnaissance du pathogène de manière indépendante des cellules T, et le deuxième, impliquant la stimulation des CPAs, via leur CD40, avec un ligand CD40L (soluble ou membranaire) durant l'interaction lymphocyte T-CPA (révisé par Kang et al., 2005).

Il a été suggéré que l'IL-12p70 est davantage un produit plutôt qu'une cause de la différenciation T_H1 , et que l'IL-12p40 serait celle responsable de la différenciation T_H1 (Abdi, 2002) contrairement à ce stipulé par d'autres (Mazzeo et al., 2002) dans lesquelles le lien entre l'immunité innée et adaptative était davantage conféré à l'hétérodimère (Abdi, 2002).

Des facteurs de transcription sensibles au stress oxydatif (par exemple le NFκB) régulent à la hausse l'expression d'IL-12p40 de façon plus marquée que l'expression de la sous-unité IL-12p35 (Obata et al., 2006). Il a été suggéré que l'excès de sous-unités monomériques d'IL-12p40 ainsi

produites pourrait favoriser la formation d'homodimères stables, pouvant agir comme antagonistes de l'IL-12p70 (Heinzel et al., 1997; Ling et al., 1995; Presky et al., 1998).

Dans un contexte de stress oxydatif, Obata et collaborateurs (2006) ont démontré que l'injection de H_2O_2 chez des souris augmentait à la fois la production d'IL-12p40 et d'IL-12p70, en favorisant néanmoins une hausse dans le ratio IL-12p40/p70 (Obata et al., 2006)

1.5.2 Effet d'agents thiolés sur la production d'IL-12

Un déplacement d'une réponse immunitaire T_H2 vers T_H1 , lors de l'administration *in vivo* de N-acétyl cystéine (NAC) ou d'autres précurseurs thiolés, a été décrit (Dobashi et al., 2001; Murata et al., 2002a; Murata et al., 2002b). De plus, une inhibition de la GSH réductase (enzyme responsable de la réduction du GSSG en GSH) augmentait la production d'IL-12p40 induite par LPS (Gamain et al., 1996; Komatsu et al., 2003). De par ces résultats, il a été suggéré que le stress oxydatif induit par l'inhibition de la GSH réductase augmentait l'activation de NF κ B et résultait ainsi en une surproduction de la sous-unité p40. Ces données semblent contredire d'autres études démontrant que le stress oxydatif supprime la production d'IL-12p40 (Dobashi et al., 2001; Kroening et al., 2008; Murata et al., 2002b; Peterson et al., 1998).

1.6 Hème oxygénase-1 (HO-1)

L'hème est un cofacteur composé d'un atome de fer lié à 4 groupes de porphyrine (Figueiredo et al., 2007) et capable de lier le dioxygène (O_2). En faible quantité, l'hème procure des fonctions cellulaires diverses et indispensables (tel le transport de l'oxygène effectué par des protéines dépendantes de l'hème (telle l'Hb)). Or, lorsqu'il est présent en excès, l'hème libre cause des dommages tissulaires sévères en raison de sa capacité à catalyser la formation d'EROs, résultant en un stress oxydatif (Wagener et al., 2003). En effet, la toxicité du fer repose principalement sur la chimie des réactions de Fenton et Haber-Weiss, via lesquelles des radicaux hydroxyls sont générés à partir de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène et ce, en présence de quantité catalytique de fer (Papanikolaou et Pantopoulos, 2005)

L'accumulation d'hème au sein des cellules, sous sa forme libre, surcharge la capacité des agents éboueurs de cette molécule (Jeney et al., 2002; Muller-Eberhard et al., 1968). Les deux mécanismes par lesquels l'hème exerce ses effets négatifs sont à présent acceptés : tout d'abord, de par sa nature amphipathique, l'hème peut s'insérer au sein de la membrane cellulaire (Figueiredo et al., 2007; Wagener et al., 2003). Un deuxième mode d'action implique les effets pro-oxydants de cette molécule (Figueiredo et al., 2007).

La hème oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme de réponse au stress (Lee et Chau, 2002; Udono-Fujimori et al., 2004) qui est fortement induite par l'hème (Lehmann et al., 2007; Udono-Fujimori et al., 2004) ainsi que par d'autres facteurs tel que le choc thermique, l'hyperoxie, l'hypoxie, les endotoxines, les prostaglandines, les cytokines pro-inflammatoires (Otterbein et Choi, 2000) et le produit de peroxydation des lipides 4-hydroxynonéal (HNE) (Iles et al., 2005). La HO-1 catalyse la dégradation de l'hème en fer, monoxide de carbone (CO) ainsi qu'en biliverdine (Bach, 2006; Lee et Chau, 2002; Yet et al., 2002). Cette dernière est par la suite réduite en bilirubine, à laquelle des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Lee et Chau, 2002) ont été attribuées tout comme il en est le cas pour le CO (Bach, 2006).

Une grande diversité de cascades de signalisation cellulaires est impliquée dans l'induction de la HO-1. En effet, plusieurs éléments régulateurs sont présents dans la région promotrice de cette enzyme, spécifiquement dans des sites de liaison à l'ADN pour des facteurs de transcription en réponse au stress oxydatif, tel que le NFκB. Des régulateurs négatifs de cette enzyme existent, représentés par des éboueurs des EROs.

L'expression de la HO-1, aussi connue sous le nom de la HSP32 (heat shock protein 32), est induite *in vivo* suite à une situation de stress, telle une exposition à de l'hème ou à des métaux lourds. Elle semble également être induite lors de réponses inflammatoires. L'expression de la HO-1 résulte entre autres de l'activation de la p38 MAPK (Wijayanti et al., 2004). Cette enzyme semble protéger les cellules des dommages associés aux oxydants (Woo et al., 1998). En effet, les oxydants peuvent induire la dégradation de nombreuses protéines contenant de l'hème et ainsi, mener à une libération d'hème (Tyrrell, 1999). Cette enzyme assure l'élimination des molécules d'hème qui risqueraient entre autres d'endommager les membranes cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 1988). La HO-1 demeure active même à de faibles concentrations de substrats et son activité est amplifiée lorsque la concentration d'hème augmente au-delà des niveaux physiologiques. Plusieurs voies de signalisation indépendantes du statut redox, telles les kinases (Alam et al., 1995; Elbirt et al., 1998; Immenschuh et al., 1998) et les protéines phosphatases (Immenschuh et al., 2000), ont été impliquées dans la régulation du gène de la HO-1.

1.7 La voie de la p38 MAPK

De multiples composants de signalisation, incluant les cascades de protéines kinases activées par les mitogènes (MAP kinase), NFκB, les molécules contrôlant l'AMP cyclique, les canaux et pompes ioniques membranaires, l'oxyde nitrique (NO) ainsi que les récepteurs internes et de surfaces cellulaires, sont impliqués dans la production d'IL-12p70 par les CPAs (Kang et al.,

2005). Dans les cellules de mammifères, trois principaux sous-groupes de MAP kinases ont jusqu'à présent été identifiés : la MAPK ERK, JNK ainsi que la p38.

Le LPS induit la sécrétion d'IL-12 principalement par la voie de la p38 MAP kinase, qui est sous régulation redox par le GSH (Utsugi et al., 2002). Une pré-stimulation de la production d'IL-12 par l'IFN γ est partiellement un résultat de la balance redox du GSH, puisqu'une déplétion du GSH par les oxydants inhibe significativement la production d'IL-12p40 et d'IL-12p70 en réponse au IFN γ /LPS. La pré-stimulation avec l'IFN γ augmente le ratio intracellulaire GSH/GSSG et augmente davantage la production d'IL-12 par la voie de la p38 MAP kinase (Utsugi et al., 2002).

1.8 NF κ B

La voie de NF κ B est l'une des principales voies redox-sensibles impliquées dans la réponse au stress oxydatif (Obata et al., 2006). Il a largement été établi que malgré le fait que l'activation de ce facteur de transcription soit induite par les oxydants (Haddad et Harb, 2005), sa liaison à l'ADN est inhibée par des ratios élevés de GSSG/GSH au noyau (Brennan et O'Neill, 1996; Haddad, 2002). En effet, pour que la liaison à l'ADN soit possible, des conditions réduites au noyau sont nécessaires.

L'expression des gènes des sous-unités IL-12p40 et IL-12p35 est sous le contrôle de NF κ B (Obata et al., 2006). Dans la majorité des types cellulaires, NF κ B existe dans une forme cytoplasmique inactive associée à une protéine inhibitrice, l'I κ B, qui se lie aux composants de NF κ B, p50 et p65, inhibant leur translocation au noyau (Schreck et al., 1992). Suite à un signal pro-inflammatoire approprié, I κ B est phosphorylé et ensuite ubiquitiné. Le protéasome dégrade alors ce répresseur et NF κ B migre vers le noyau et se lie à l'ADN (Schreck et al., 1992).

La majorité des gènes cibles de NF κ B dans les cellules T ainsi que dans les autres types cellulaires codent pour des protéines impliquées dans des réponses immunitaires, inflammatoires et de phase aiguë. La stimulation des cellules par une grande variété de pathogènes ou par des cytokines inflammatoires mène à la libération de NF κ B par dégradation d'I κ B. Il a été suggéré que les radicaux de l'oxygène pouvaient agir comme messagers intracellulaires pour l'activation de NF κ B puisqu'en effet, le stress oxydatif généré par la présence de concentrations micromolaires de H₂O₂ représentait l'une des conditions induisant ce facteur transcriptionnel (Schreck et al., 1992).

Certains agents sont reconnus comme éboueurs des radicaux oxygénés, tels le dithiocarbamate, la cystéine et ses dérivés ainsi que des agents interférant avec la synthèse de

radicaux hydroxyls. En effet, Schreck et collaborateurs ont observé, en utilisant la pyrrolidine dithiocarbamate (PDCT), que l'activation induite par Tax (une oncoprotéine virale (Azran et al., 2004)) de l'activité de liaison à l'ADN de NF κ B était fortement supprimée par l'antioxydant PDCT (Schreck et al., 1992). Puisque la liaison de NF κ B à l'ADN est sensible aux variations du statut redox cellulaire, le stress oxydatif pourrait empêcher la liaison de NF κ B à l'ADN. La réduction de NF κ B par la TRX, suite à la dissociation de I κ B, est requise pour la liaison de NF κ B au site κ B (Nakamura et al., 1997). Donc, afin de favoriser la liaison de facteurs de transcription à l'ADN, des conditions réductrices dans le noyau des cellules doivent exister, tandis que dans le cytoplasme, le stress oxydatif est requis pour l'induction de ces facteurs. Il est à présent établi que le stress oxydatif induit rapidement la translocation de la TRX dans le noyau à cette fin (Nakamura et al., 1997). La TRX est une enzyme ayant le pouvoir de réactiver les facteurs de transcription inactivés par une oxydation lorsqu'elle est préalablement réduite par une action combinée de la TRX réductase et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Wiesel et al., 2000).

1.9 Cycle de vie de *Plasmodium*

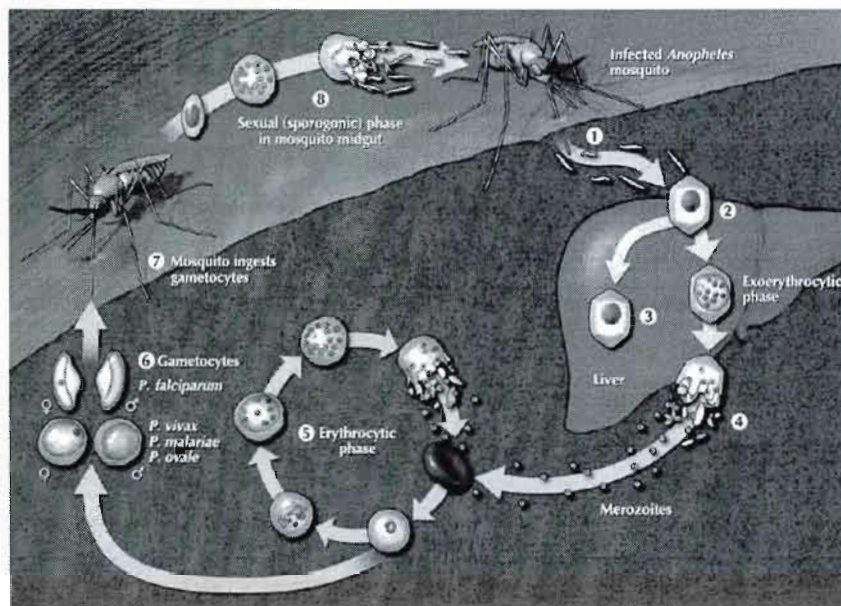


Figure 1.1 : Cycle de vie de *Plasmodium* chez ses deux hôtes : l'homme et le moustique *Anophele* femelle. (Tirée de Suh et al., 2004).

Plasmodium a évolué simultanément avec ses deux hôtes : l'homme et le moustique *Anophele* femelle. Chez le moustique, *Plasmodium* effectue un cycle de vie sexué alors que chez son hôte

mammifère, il effectue un cycle de vie asexué (Suh et al., 2004). Lors d'un repas sanguin, une femelle *Anophèle* transfère le parasite, sous la forme de sporozoïte, par sa salive à un hôte mammifère. Dans l'hôte mammifère, les sporozoïtes sont éliminés de la circulation sanguine en 1-2 heures et sont localisés dans les cellules du parenchyme hépatique (Deans et Cohen, 1983). Dans le foie, les sporozoïtes pénètrent les cellules hépatiques et commencent à se nourrir et à croître. Graduellement, le noyau du parasite subit de multiples divisions avant de produire des milliers de nouvelles cellules parasitaires sous la forme de mérozoïtes. Une semaine plus tard, les hépatocytes sont lysés et des mérozoïtes sont libérés afin de rejoindre la circulation sanguine. Dans la circulation sanguine, les mérozoïtes infectent les érythrocytes, où ils se reproduisent et sont libérés lors de la lyse de l'érythrocyte infecté. Ces mêmes mérozoïtes peuvent alors infecter de nouveaux érythrocytes. Suite à une période de réplication purement asexuée des parasites érythrocytaires, une petite proportion de mérozoïtes nouvellement produits se différencie en gamétocytes (mâles et femelles), mûrit et subit une division cellulaire sur une période d'environ 10 jours. La reproduction sexuée a lieu dans le moustique suite à l'ingestion de gamétocytes (Deans et Cohen, 1983).

1.10 Stress oxydatif et malaria

La malaria, maladie transmise par des moustiques *Anophèles* et causée par des parasites du genre *Plasmodium* (Lamb et al., 2006), est responsable de 300 à 500 cas cliniques ainsi que de 2 à 3 millions de morts annuellement (Moorthy et al., 2004; Wykes et Good, 2007)

La défense de l'hôte contre les infections par *Plasmodium* est contrôlée par le système immunitaire inné et adaptatif. Globalement, les réponses immunitaires visant à contrer les infections par *Plasmodium* résultent en la destruction des parasites, mais ces réponses sont aussi exacerbées et conduisent à des dommages à l'hôte (Lamb et al., 2006). La réponse immunitaire innée implique la phagocytose et l'inflammation, caractérisée par une surproduction de TNF- α (facteur de nécrose tumorale- α) et de NO, ainsi que par la génération des EROs. Or, ces mécanismes de défense sont en grande partie responsables de la pathologie de la maladie (Becker et al., 2004).

Luty et collaborateurs (2000) ont suggéré que l'immunité protectrice dans la malaria est contrôlée par une cascade d'événements impliquant la production d'IL-12, cette dernière étant induite par l'IFN γ , le TNF- α et le NO. Ils ont également établi une corrélation inverse entre les niveaux d'IL-12 et ceux de la parasitémie (pourcentage des GRp sanguins) ainsi qu'avec la

quantité d’HZ emmagasinée dans les neutrophiles en circulation (Luty et al., 2000). Dans une étude, ils ont démontré que des sujets ayant une hyperparasitémie par *P. falciparum* avaient un taux significativement inférieur de cellules T CD4⁺ sécrétant de l’IFN γ dans le sang périphérique. Ils ont relié cette chute d’IL-12 à la diminution de la sous-population de cellules T CD4⁺, étant donné que l’IFN γ produit par ces cellules stimule davantage la production d’IL-12 chez des monocytes humains (Luty et al., 2000). De plus, les niveaux plasmatiques d’IL-10 et de TNF- α chez des patients atteints de malaria sévère étaient significativement plus élevés et la concentration de ces deux cytokines était directement associée à la parasitémie et au nombre de phagocytes chargés d’HZ dans le sang (Luty et al., 2000).

Durant les infections par *Plasmodium* chez l’homme ainsi que chez des modèles expérimentaux (primates, souris), un fort stress oxydatif est généré, en partie dû au métabolisme des composants riches en fer (Becker et al., 2004; Schwarzer et al., 2003). En effet, le stress oxydatif est généré dans les cellules phagocytaires comme conséquence de l’ingestion de GRp riches en fer ainsi que des GRs (Kumar et Bandyopadhyay, 2005). Dans la même direction, nous avons démontré que, chez le modèle expérimental murin utilisé au sein de notre laboratoire (*P. chabaudi adami*), une infection tant par la souche virulente (DS) que par la souche non virulente (DK), mène à une forte production d’EROs au sein des Mps péritonéaux (pMps) de souris BALB/c (données non présentées).

Une des conséquences du paludisme consiste en une diminution des enzymes anti-oxydantes et des composés tels la catalase, la GSH peroxydase, les SOD, le GSH et bien d’autres (Delmas-Beauvieux et al., 1995; Erel et al., 1997; Luersen et al., 2000; Mathews et Selvam, 1991) ainsi qu’une augmentation de la production des EROs. En effet, les faibles niveaux d’enzymes anti-oxydantes observés durant la phase aiguë de la malaria seraient attribués au fait qu’une activité enzymatique élevée est nécessaire afin de protéger et régénérer les érythrocytes durant l’hémolyse, causée par une production excessive de radicaux superoxyde (Delmas-Beauvieux et al., 1995). Ainsi, le stress oxydatif induit durant ces infections semblerait résulter d’un déséquilibre entre cette diminution des enzymes anti-oxydantes et cette production accrue d’EROs. Deux mécanismes distincts sont responsables de la production d’EROs durant les infections par *Plasmodium* : les électrons produits lors de l’oxydation du Fe²⁺ en Fe³⁺ suite à la dégradation de l’Hb par le parasite réagissent avec l’oxygène moléculaire pour former des EROs, puis il y a l’activation de la réponse immunitaire de l’hôte, lors de laquelle il y a production de cytokines pro-inflammatoires (telles le TNF- α et l’IFN γ) qui augmentent la flambée respiratoire

(EROs) chez les phagocytes (Pabon et al., 2003). Ainsi, la production d'EROs par l'hôte semble faire partie de ses défenses naturelles contre le parasite (Postma et al., 1996).

Le stress oxydatif observé durant ces infections semble avoir un rôle protecteur ainsi qu'un rôle favorisant la pathologie de la malaria (Pabon et al., 2003). En effet, la protection conférée par le stress oxydatif serait attribuée à la vulnérabilité du parasite aux EROs (Pabon et al., 2003; Postma et al., 1996). De plus, des caractéristiques génétiques de l'hôte pourraient augmenter la susceptibilité des érythrocytes à produire de hauts niveaux d'EROs tel que des déficiences en glucose-6-phosphate déshydrogénase, la thalassémie et l'anémie à hématies falciformes puisque ces conditions confèrent une protection contre la malaria par *P. falciparum* chez l'homme (Pabon et al., 2003).

Il y a une corrélation positive entre les EROs produites durant les infections de la malaria avec la pathologie cérébrale (Pabon et al., 2003). Dans la même direction, Griffiths et collaborateurs (2001) ont observé que durant les infections par *Plasmodium*, l'augmentation d'EROs pourrait mener à un dommage membranaire des érythrocytes et contribuer à leur destruction et à l'anémie (Griffiths et al., 2001). De plus, Taramelli et collaborateurs (2000) ont suggéré que l'inhibition de la production de cytokines suite à un pré-traitement avec de l'HZ pouvait être liée au stress oxydatif induit par le pigment paludique. En effet, des composés riches en thiols restauraient partiellement les fonctions des pMps traités avec de l'HZ et les niveaux d'ARNm de la HO-1 et de la catalase étaient augmentés de même que la production de radicaux libres au sein des cellules traitées avec la β -hématine (pigment synthétisé *in vitro* étant chimiquement et structurellement identique à l'HZ native (Tripathi et al., 2004 ; Taramelli et al., 2000).

L'élimination des érythrocytes sénescents ou parasités est soutenue par l'érythrophagocytose, laquelle induit au sein des monocytes-Mps l'enzyme NADPH oxydase, qui est responsable de la flambée respiratoire. L'induction de cette enzyme mène à la génération de dérivés oxygénés toxiques. Clerget et Polla (1990) ont démontré qu'au cours de l'érythrophagocytose, des monocytes ainsi que des Mps humains synthétisaient de la HO-1, cette dernière étant entre autres induite par l'HE (qui est le produit d'oxydation Fe^{3+} de l'hème). De plus, il semblerait que l'induction de la HO-1 puisse être prévenue en présence d'érythrocytes-fantômes libérés d'Hb. Ainsi, le rôle du fer dérivé de l'Hb a pu être établi ainsi que celui des radicaux oxygénés produits lors de l'érythrophagocytose sur les Mps (Clerget et Polla, 1990).

1.11 Hémozoïne

Le pigment de la malaria, connu sous le nom d’HZ, est un polymère insoluble de l’hème (protoporphyrine IX) produit par le parasite suite à la dégradation de l’Hb à l’intérieur des GRs (Francis et al., 1997). Puisque l’Hb représente la principale source d’acides aminés pour le parasite, il y a une forte dégradation de l’Hb de l’hôte au cours de l’infection (Becker et al., 2004). En effet, durant les infections par *Plasmodium*, entre 75 et 100% de l’Hb de l’hôte est dégradée (Schwarzer et al., 2003; Schwarzer et al., 1996). La plasmepsine 1 est responsable du clivage de l’Hb en hème libre et en globine. L’hème libre, qui est toxique pour le parasite en raison de son habileté à déstabiliser et lyser les membranes, de même qu’à inhiber l’activité de plusieurs enzymes, est polymérisé par le parasite sous la forme du polymère d’HZ via un mécanisme peu connu jusqu’à présent. Ce pigment est décrit dans la littérature comme étant un agent oxydant (Basilico et al., 2003; Skorokhod et al., 2004) mais cette propriété semble varier, dépendamment des préparations natives versus synthétiques (Basilico et al., 2003; Kumar et Bandyopadhyay, 2005). En effet, les préparations d’HZ varient largement selon les différents laboratoires et peuvent contenir des lipides associés, des protéines, des hydrates de carbone ainsi que des anneaux poly-porphyriques. Il a été démontré que l’élimination des lipides associés à l’HZ abolissait sa bio-activité (Riley et al., 2006). Plusieurs laboratoires ont démontré que l’HZ ainsi que la β -hématine (HZ synthétique) engendrent des patrons similaires de cytokines pro- et anti-inflammatoires, de molécules effectrices et de chimiokines (Riley et al., 2006).

Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que l’HZ libre ainsi que les GRp sont avidement phagocytés par les monocytes en circulation, les neutrophiles ainsi que par les Mps résidents (Schwarzer et al., 2003; Schwarzer et al., 1996; Schwarzer et al., 1992; Turrini et al., 1992). L’HZ accumulée dans la vacuole digestive du parasite inhibe les fonctions cellulaires importantes des monocytes suite à l’ingestion des GRp, qui sont incapables de les métaboliser, de répéter la phagocytose ainsi que de générer des flambées respiratoires suite à un stimulus approprié (telle la phagocytose d’un pathogène) (Fiori et al., 1993; Schwarzer et al., 2003; Schwarzer et al., 1996; Schwarzer et al., 1992). Cette accumulation d’HZ semble inhiber la fonction du Mp et sa capacité à activer les cellules T et de produire de l’IL-2 mais le mécanisme par lequel la suppression est déclenchée n’a pas encore été élucidé (Morakote et Justus, 1988; Scorza et al., 1999). L’HZ inhibe la production de plusieurs cytokines (entre autres l’IL-2) et semble donc jouer un rôle important dans l’immunosuppression associée à l’infection (Schwarzer et al., 2003; Scorza et al., 1999). De plus, l’HZ active la production de facteurs suppressifs, indépendants de NO et des

prostaglandines pouvant supprimer les fonctions des cellules T (Moore et al., 2004; Scorza et al., 1999).

L'HZ possède une activité pro-oxydante qui semble dépendre de la taille des cristaux; en effet, Oliveira et collaborateurs (2002) ont observé que la réduction de la taille de la particule d'HZ engendrait des taux plus élevés d'oxydation, taux similaires à ceux observés lorsque de l'hème libre était utilisé, en supposant qu'au sein de l'HZ, les seules molécules d'hème pouvant participer à la formation de radicaux sont celles en surface du cristal (Oliveira et al., 2002).

Des études *in vitro* chez des cellules mononucléaires humaines et murines, ont démontré que l'ingestion d'HZ augmente la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (Biswas et al., 2001; Pichyangkul et al., 1994; Sherry et al., 1995) et le NO (Jaramillo et al., 2003; Keller et al., 2004). De plus, l'HZ inhibe la maturation des CD, causant la suppression des réponses générales prolifératives des leucocytes humains et engendrant le dysfonctionnement des monocytes/Mps. Le tout indique que l'HZ est hautement immunosuppressive (Riley et al., 2006). L'effet inhibiteur des infections par *Plasmodium* peut être lié au fait que l'HZ, en s'accumulant au sein des Mps, est responsable de cette suppression et cet effet peut être mimé *in vitro* par le traitement avec de l'HZ (Scorza et al., 1999).

Au sein de notre laboratoire, une augmentation de l'expression du CD11b à la surface des BMMps de souris infectées par la souche DS de *Plasmodium c. adami* a été observée; ces cellules CD11b⁺ en provenance de souris infectées par *Plasmodium* ont des niveaux d'EROs plus élevés que celles de souris non infectées et sont des cellules phagocytaires chargées en HZ (données non présentées). Perry et collaborateurs (2005) expliquent, à ce sujet, qu'un lien existe entre l'augmentation de l'expression du CD11b et l'augmentation de l'activité phagocytaire. En effet, les cellules avec une capacité phagocytaire élevée semblent davantage affectées par l'infection par *Plasmodium*, ceci étant indirectement confirmé par le fait que les cellules exprimant de hauts taux de CD11b contenaient un taux élevé de pigments d'HZ (Perry et al., 2005).

1.12 Antioxydants et malaria

Afin de limiter les dommages causés par un stress lié à la surproduction d'EROs, des systèmes antioxydants intra- ainsi que extracellulaires sont présents. Un traitement par des antioxydants vise à renforcer ces systèmes déjà présents et protège l'hôte. En effet, il a été suggéré que l'administration de vitamine E ou de trolox protégeait partiellement contre la malaria cérébrale (Postma et al., 1996). En effet, une protection de l'intégrité de la membrane vasculaire envers les

effets dévastateurs des EROs peut être envisagée par un traitement avec des antioxydants (Postma et al., 1996). Dans la même direction, Thumwood et collaborateurs (1989) ont observé chez le modèle murin que l'administration (*in vitro* ainsi que *in vivo*) d'éboueurs de radicaux, de catalase ou bien d'enzymes SOD pouvait prévenir la malaria cérébrale (Thumwood et al., 1989). Par le biais d'une diète supplémentée en hydroxyanisole butylé (un éboueur de radicaux) vouée à des souris, ce groupe de chercheurs a observé entre autres une diminution/disparition des symptômes cérébraux ainsi qu'une diminution importante du développement des hémorragies et des œdèmes dans le système nerveux central (Thumwood et al., 1989).

Il a été proposé que les défenses anti-oxydantes des cellules déterminaient la réponse à la β -hématine ; les cellules présentant une plus faible étendue de l'induction de l'ARNm de la HO-1 et de la catalase ainsi qu'une plus faible accumulation de radicaux hydrogène sont moins sensibles à l'effet inhibiteur de la β -hématine sur la production de cytokines (Taramelli et al., 2000).

1.13 Objectifs

Par ce travail, nous tenions à vérifier si l'inhibition des réponses d'IL-12p70 et d'IL-12p40 (induites par du LPS ou IFN γ /LPS) associée à une accumulation du pigment paludique au sein des BMMps était due à une augmentation de la production d'IL-10, qui est le principal inhibiteur physiologique de l'IL-12, ou à une augmentation de la production d'EROs. Ces deux facteurs ont été liés à cette inhibition (dans d'autres modèles d'études) ainsi qu'à l'inhibition de l'IL-12 par d'autres oxydants. De plus, nous cherchions à vérifier si l'HZ se comportait comme un oxydant et pour ce faire, nous avons utilisé l'HE, qui est également libéré dans la circulation lors d'infections par *Plasmodium*. Un autre de nos objectifs consistait à déterminer si l'ajout de composés réducteurs au moment de la stimulation pouvait restaurer la production d'IL-12 inhibée par l'HZ, l'HE et le DEM. Finalement, il nous semblait important de comparer la réponse des BMMps prétraités ou non avec de l'HZ aux inhibiteurs de différentes voies activées par le LPS et impliquées dans la production d'IL-12 afin d'établir si des comportements comparables étaient observés.

CHAPITRE II

DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

2.1 Isolation et préparation des macrophages.

Les BMMps ont été préparés par récupération de la moelle osseuse des fémurs de souris BALB/c femelles de 6-8 semaines (Charles River). Les fémurs de souris ont été isolés et tous les tissus musculaires ont été retirés. Les os intacts ont été désinfectés à l'éthanol 70% pendant 2-3 minutes et ensuite lavés deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS). Chaque extrémité de l'os était coupée et le canal de la moelle, expulsé avec du milieu RPMI supplémenté de 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (P/S) en utilisant une seringue de 1ml ayant une aiguille de ½CC. Les cellules récupérées ont été lavées et mises en culture à une concentration de 10^6 cellules/mL dans du milieu DMEM supplémenté de 10% FBS, 100 U/mL P/S et 30% de surnageant de cultures confluentes de fibroblastes murins L929 a été ajouté en tant que source de facteur de stimulation de colonies de Mps (M-CSF). Après 6 jours d'incubation à 37°C dans 5% de CO₂, le milieu était retiré par pipetage et un léger lavage effectué afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Une analyse de la préparation cellulaire par cytométrie de flux a révélé que celle-ci consistait de $\geq 77\%$ de cellules CD11b⁺ (granulocytes/macrophages) (données non présentées).

2.2 Traitement *in vitro*.

Les BMMps ont été mis en culture à une densité de 5×10^4 cellules/puits dans une plaque de 96 puits et dans un volume final de 200µL. Les cellules ont été traitées avec de l'HZ (généreusement fournie par le Dr Martin Olivier, 5, 10 et 25µg/mL) et de l'HE (Sigma, 5, 10 et 25µg/mL) pour 24h, ou avec du DEM (Sigma, 25µM) pour 4h et conservées en culture pendant 24h supplémentaires en présence ou absence de NAC exogène (Sigma, 0.25mM).

2.3 Traitement avec inhibiteurs.

Les BMMps prétraités avec l'HZ, l'HE ou le DEM ont été traités pour 1 heure avec des inhibiteurs de NFκB (CAPE 10 ou 20µM, BioMol), de la p38 MAP kinase (SB203580; 0,1 ou

1 μ M, Sigma), de la MAP kinase JNK (SP600125 : 10 μ M, BioMol) ou de la MAP kinase ERK (Apigenin : 25 ou 50 μ M, BioMol) préalablement à la stimulation pour la production d'IL-12p70.

2.4 Induction et évaluation des réponses d'IL-12.

La sécrétion d'IL-12p70 a été induite dans les BMMps par une stimulation avec du LPS (50 ng/mL, SIGMA) précédé ou non d'une stimulation de 15 min avec de l'IFN γ recombinant murin (50 U/mL, Cederlane) et les niveaux d'IL-12p70, d'IL-10 et d'IL-12p40 ont été déterminés dans les surnageants de 24 heures de culture par ELISA (BD OpTEIA Set Mouse IL-12 (p70), BD Biosciences, BD OpTEIA Set Mouse IL-10, BD Biosciences et ELISA MAXTM Set *Deluxe* Mouse IL-12(p40), BioLegend, respectivement), en suivant les instructions du fabricant.

2.5 Évaluation des EROs.

Les BMMps ont été ajoutés dans des tubes de polypropylène et marqués avec la sonde H₂-DCFDA (100 μ M, Molecular Probe, Invitrogen) pour 30min à 37°C. Les cellules ont par la suite été lavées à deux reprises avec du PBS et puis traitées pendant 1h avec de l'HZ (5, 10 ou 25 μ g/mL), de l'HE (5, 10 ou 25 μ g/mL) ou du DEM (25 μ M). Nous avons utilisé du H₂O₂ en tant que témoin positif (0.5mM). La fluorescence moyenne a été mesurée à l'aide d'un cytofluoromètre FACscan.

2.6 Détermination des niveaux intracellulaires de GSH.

Les BMMps ont été mis en culture à une densité de 5 x 10⁵ cellules/puits dans un volume final de 500 μ L de RPMI 1640 supplémenté avec 10% FBS et P/S et par la suite traités pendant 24h avec de l'HZ ou de l'HE (25 μ g/mL), suivi d'un traitement supplémentaire de 24h avec de l'IFN γ (50U/mL) ou de 4h avec du NAC (0.25mM). Les surnageants ont été retirés, les cellules rincées à deux reprises avec du PBS puis lysées par sonication dans du tampon MES froid (0.2M acide 2-(N-morpholino) éthanesulphonique, 50mM phosphate et 1mM EDTA, pH 6.0). L'homogénat cellulaire a par la suite été centrifugé à 10 000g pendant 15 minutes à 4°C et les surnageants ont été récoltés et conservés sur glace. Les échantillons étaient à ce moment déprotéinés en ajoutant un volume équivalent de réactif MPA (acide métaphosphorique), puis vortexés et laissés à température pièce pour 5 minutes. Finalement, une centrifugation à 5000g pour 5 min a été effectuée et les surnageants ont été récupérés sans déranger le précipité. Cinquante microlitres de TEAM (solution 4M de triéthanolamine) ont été ajoutés par mL d'échantillon puis vortexés immédiatement. Les échantillons étaient, à ce moment, prêts pour le dosage du GSH total (i-e à la

fois oxydé et réduit). Chaque échantillon a été divisé en deux afin de quantifier le GSH total et oxydé (GSSG).

Pour la détermination du GSSG, tout GSH réduit était dérivé en GSSG par un traitement avec du 2-vinylpyridine. À cette fin, 10 μ L d'une solution de 1 M 2-vinylpyridine a été ajouté par mL d'échantillon, vortexé et incubé à température pièce pour 60 minutes.

Cinquante microlitres de standards (ou standards dérivés) ou d'échantillons ont été ajoutés dans les puits avant l'addition de 150 μ L de Cocktail de dosage contenant : du tampon MES, un mélange «Cofacteur reconstitué», un mélange d'enzymes reconstituées, de l'eau ainsi qu'un réactif DTNB. La plaque a par la suite été recouverte puis incubée à la noirceur sous agitation orbitale pour 35 minutes. La densité optique a alors été mesurée à 405 nm sur un spectrophotomètre.

2.7 Activité métabolique.

L'activité métabolique des BMMps a été évaluée au sein des divers traitements effectués en utilisant une solution «CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)» (Promega), mesurant la prolifération cellulaire.

2.8 Analyses statistiques.

Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel GraphPad Prism, pour des tests T-Student non paramétriques (lorsque indiqué) ou des analyses Anova (test multiple de comparaison de Turkey).

CHAPITRE III

ARTICLE : Hemozoin and Hemin inhibit IL-12p70 responses through an IL-10/p38 MAPK-independent mechanism that may involve upregulation of reduced glutathione

STÉFANY BAZINET¹, AUDREY CHOLE¹, MANON RICHAUD¹, MARTIN OLIVIER², AND TATIANA SCORZA¹

¹Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Case postale 8888, Succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

²Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, Canada

3.1 Abstract

In malaria, defective IL-12 production correlates with severe anaemia and dyserythropoiesis, and it has been suggested that the malaria pigment hemozoin (HZ) inhibits IL-12p40 gene expression in human monocytes through an IL-10-dependent mechanism. In this context, several studies have linked the anti-inflammatory effects of HZ to an iron-dependent oxidative stress, albeit the fact that HZ seems a poor inducer of reactive oxygen species (ROS) *in vitro*. Interestingly, iron-dependent oxidative stress leads to the induction of heme oxygenase-1 (HO-1) through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. As this stress-inducible protein seems pivotal for the anti-inflammatory effects of IL-10, the effects of synthetic HZ and haemin (HE) on ROS and HO-1 induction were studied in murine bone marrow-derived macrophages (BMMs). In addition, IL-12p40 and IL-12p70 production in response to LPS or IFN γ /LPS stimulation was compared, as well as the effect of exogenous n-Acetylcysteine (NAC) on these responses. In contrast to HZ, HE was shown to be a strong inducer of HO-1 and ROS. None of these two iron-containing compounds up-regulated IL-10 production in response to LPS, but both compounds significantly decreased IL-12p70 and IL-12p40 in LPS or IFN γ /LPS primed BMMs. Interestingly, the inhibition of the p38 MAP kinase led to a significant drop in IL-10 production and enhanced IL-12p70 secretion in control and HZ-treated BMMs, but failed to rescue the deficient IL-12p70 response to IFN γ and LPS in HZ and HE-conditioned BMMs. The inhibitory effects of HZ and HE on IL-12p70 production were refractory to treatment with NAC. Importantly, increased GSH/GSSG ratios were measured in BMMs treated with HZ and HE for 24h, and in those cells, IFN γ failed to further upregulate the GSH/GSSG ratios. Our results suggest that HZ down-regulates IL-12p70 production in murine BMMs through a mechanism independent of the p38 MAP kinase-IL-10 pathway that may rely on upregulation of GSH levels.

3.2 Introduction

IL-12p70 is a cytokine composed of two disulfide-linked subunits of 35kDa and 40kDa (p35 and p40) encoded by two distinct genes (Kobayashi et al., 1989). The p35 subunit constitutively transcribed and regulated after translation (Aste-Amezaga et al., 1998), has been shown to be selectively activated by Interferon Regulatory factor-1 in response to LPS (Goriely et al., 2006; Liu et al., 2003; Liu et al., 2004; Negishi et al., 2006). The IL-12p40 subunit, under transcriptional control, is induced by several stimuli such as bacterial products (LPS, CpG and others) (D'Andrea et al., 1992; Hsieh et al., 1993).

Production of bioactive IL-12p70 by antigen presenting cells is a complex response regulated through multiple signalling components including the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades, NF κ B, cyclic AMP-modulating molecules, cell membrane ion channels and pumps (reviewed by Kang et al., 2005). In macrophages (Mps), low levels of intracellular reduced glutathione (GSH) result in deficient IL-12 and elevated IL-10 responses (Murata et al., 2001; Murata et al., 2002b). In this context, IFN γ has been shown to increase intracellular GSH/GSSG ratios in human monocytes, which seems required for its enhancement of IL-12p70 production via the p38 MAPK signalling pathway; the effect is sensitive to treatment with diethyl maleate (DEM), a GSH depleting agent (Utsugi et al., 2002).

In Mps, iron-dependent oxidative stress induces heme oxygenase-1 (HO-1), an enzyme that degrades heme to generate biliverdin, free iron and carbon monoxide (CO) (Chauveau et al., 2005). HO-1 over-expression has been associated to inhibition of cellular immunity (Woo et al., 1998) in part through CO generation, which turns down LPS-induced pro-inflammatory cytokines and increases IL-10 production (Chauveau et al., 2005). IL-10 on the other hand has been shown to induce HO-1 expression (Lee and Chau, 2002), which further generates CO and IL-10 in a “positive feedback loop”.

In human blood stage malaria, the severity of anaemia correlates with deficient IL-12p40/IL-12p70 and increased IL-10 responses (Chaisavaneeyakorn et al., 2003; Chaiyaroj et al., 2004; Luty et al., 2000; Ong'echa et al., 2008; Perkins et al., 2000; Wroczynska et al., 2005). During *Plasmodium* blood stage infection, Mps avidly ingest parasitized and non parasitized red blood cells, containing hemozoin, hemoglobin and free heme, and accumulate hemozoin (HZ), the ladder being a β -hematin polymer which is not metabolized (Schwarzer et al., 1999). Deficient IL-12p40 and IL-12p70 responses correlate with HZ accumulation in human monocytes (Casals-Pascual et al., 2006; Luty et al., 2000), and recently, it has been suggested that HZ inhibits IL-

IL-12p40 gene expression through its ability to over induce IL-10 (Keller et al., 2006). Interestingly, HZ has been shown to down-regulate nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF)- α production through redox-dependent stress (Taramelli et al., 2000). However, although numerous studies have associated potent pro-oxidant activities to native and synthetic HZ, their interpretation remains confusing. Omodeo-Salè and collaborators (2001) suggested that the pro-oxidant effects of HZ were dependent on the oxidative status of cell membranes (Omodeo-Salè et al., 2001); Oliveira et al (2002) concluded that the deleterious effects of this heme polymer depended on the size of its crystals (Oliveira et al., 2002). It remains unknown whether HZ exerts its inhibitory effects on IL-12 production through a redox-dependent mechanism; indeed oxidants such as diethyl maleate (DEM), L-buthionine and diesel exhaust particles inhibit IL-12 production in Mps by decreasing GSH/GSSG ratios or generating ROS (Dobashi et al., 2001; Murata et al., 2002b; Peterson et al., 1998; Yin et al., 2004), that may be accompanied by overproduction of IL-10 (Murata et al., 2002b; Yin et al., 2004).

In this study, we compared the oxidant properties of a synthetic form of HZ with identical crystallographic structure to native *P. falciparum* HZ, and haemin (HE) in murine bone marrow-derived macrophages (BMMps). In parallel, IL-10, IL-12p40 and IL-12p70 responses both to LPS and IFN γ /LPS stimulation were studied. Our data reveals that in contrast to HZ, HE is a strong oxidant, generating ROS and inducing HO-1, and surprisingly, both compounds significantly increased cellular GSH/GSSG ratios following treatment for 24h. The relevance of this effect on the priming of IL-12p70 by IFN γ has been studied.

3.3 Material and Methods

Isolation and preparation of Mps. BMMps were prepared by flushing the femoral marrows, collecting and plating the cells at a concentration of 10^6 cells/mL in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% FBS, 1% HEPES, P/S. Thirty percent supernatant from confluent cultures of mouse L929 fibroblasts was added as a source of Mps-colony stimulating factor. Following 6 days culture, the non-adherent cells were removed and the adherent cells were washed twice with Phosphate Buffer Saline (PBS). Analysis of the cell preparation by flow cytometry revealed $\geq 77\%$ CD11b⁺ cells (granulocytes/macrophages) (data not shown).

***In vitro* treatment with HZ, HE and NAC.** BMMps were plated at a density of 5×10^4 cells/well in a 96-well plate at a final volume of 200 μ L. Cells were treated with HZ (5, 10 and 25 μ g/mL) or HE (5, 10 and 25 μ g/mL) for 24h and were further cultured for 24h in the presence or absence of exogenous NAC (0.25mM).

Assays with inhibitor. Conditioned BMMps were treated for 1h with the p38 MAPK inhibitor (SB203580; 1 μ M) prior to stimulation for IL-12p70/IL-10 production.

Induction and measurement of IL-12 responses. IL-12p70 was induced in BMMps by stimulation with LPS (50 ng/mL, SIGMA) with or without 15min priming with recombinant murine IFN γ (50 U/mL, Cederlane) and IL-12p70, IL-10 and IL-12p40 levels were determined in 24h culture supernatants by ELISA (BD OpTEIA Set Mouse IL-12 (p70) (BD Biosciences), BD OpTEIA Set Mouse IL-10 (BD Biosciences) and ELISA MAXTM Set *Deluxe* Mouse IL-12(p40) (BioLegend), respectively), following the instructions from the manufacturer. In certain experiments, an anti-IL-10 Mab (1 μ g/mL, BioLegend) was added 15min prior to stimulation.

ROS measurements. Mps were added into polypropylene tubes and labelled with the probe H₂-DCFDA (100 μ M, Molecular Probe, Invitrogen) for 30min at 37°C, after which the cells were washed twice with PBS and treated for 1h with HZ (5, 10 or 25 μ g/mL) or Hemin (5, 10 or 25 μ g/mL). We used H₂O₂ as positive control (0.5mM). The mean fluorescence was measured in a FACscan cytofluorometer.

Western blot analysis for HO-1 expression. BMMps were incubated with HZ or HE at concentrations ranging from 5 to 25 μ g/mL at 37°C and 5% CO₂ for 4 hours. Following treatment, cells were rinsed twice with PBS and then lysed directly in Laemmli buffer. An equal volume of each sample was boiled for 5 minutes and run for electrophoresis in a 12% separation gel at 130V. The resolved proteins were transferred to a nitrocellulose membrane, and the blots were then blocked with SuperBlock Blocking Buffer (Blotto reagent) + 0.05% Tween-20 (Pierce, USA) for two hours under agitation. Membranes were then incubated overnight at 4°C under agitation with rabbit anti-HO-1 (1 μ g/mL, dilution in PBS-T, Stressgen) and with biotinylated bovine anti-rabbit IgG polyclonal antibody (1/2500 dilution in PBS-T, Cederlane) for 1 hour at room temperature. Blots were then incubated with streptavidin-Horseradish peroxidase (1/2500 dilution in PBS-T, Amersham Biosciences) for 1h30 at room temperature and further developed using an enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce)

Determination of intracellular levels of reduced GSH. BMMps were plated at a density of 5 x 10⁵ cells/well in a final volume of 500 μ L of RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and P/S and further treated with HZ or HE (25 μ g/mL) for 24h, after which IFN γ (50U/mL) or NAC (0.25mM) were added for 24h and 4h respectively. The supernatants were discarded, cells were rinsed twice with PBS and sonicated in cold MES Buffer (0.2M 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid, 50mM phosphate and 1mM EDTA, pH 6.0). Sonicated homogenates were then centrifuged at 10 000g for 15 minutes at 4°C and the supernatants were collected and stored on ice. The samples were then deproteinated by adding an equal volume of MPA reagent (metaphosphoric acid), vortexing and allowing the mixture to stand at room temperature for 5min. Finally, a centrifugation at 5000g for 5min was performed and the supernatants were collected without disturbing the precipitate. Fifty microliters of TEAM (4M solution of triethanolamine) was added per mL of sample and vortex immediately. Samples were then ready for assay of total GSH (i-e both oxidized and reduced). At this point, each sample was divided in two to assess total GSH and oxidized GSH (GSSG).

For GSSG determination, GSH was derivatized by treatment with 2-vinylpyridine. For this, 10 μ L of a solution of 1M 2-vinylpyridine was added per mL of sample, vortexed and incubated at room temperature for 60 minutes.

Fifty micro liters of standards (or derivatized standards) or samples were added to the designated wells prior to addition of 150 μ L Assay Cocktail containing: MES Buffer, reconstituted Cofactor Mixture, reconstituted Enzyme Mixture, water and reconstituted DTNB

reagent. The plate was then covered and incubated in the dark on an orbital shaker for 25 minutes, and the OD was then measured at 405nm.

Metabolic activity. Metabolic activity was assessed in BMMps using the “CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-PMS)” (Promega).

Statistical analysis. Results were analysed using the GraphPad Prism software, for non parametric T-Test (when indicated) or Anova (Turkey’s multiple comparison test).

3.4 Results

Synthetic hemozoin is not an efficient inducer of ROS and HO-1 *in vitro*

Redox-dependent inhibitory effects on TNF- α and NO have been described for synthetic HZ (Taramelli et al., 2000). As HZ was shown to stimulate IL-10 production and to inhibit IL-12p40 responses in human monocytes (Keller et al., 2006) we hypothesized that HZ induces IL-10 production and inhibits IL-12 response in a redox-dependent manner as described for other oxidants (Murata et al., 2002b; Yin et al., 2004). We considered important to compare the effects of HZ with HE as the latter is also released into circulation during malaria infection, is a potent inducer of HO-1 expression and activity *in vivo* and *in vitro* (Attuwaybi et al., 2004; Francis et al., 1997; Lang et al., 2005; Lo et al., 2006) and represents the monomeric form of heme used to prepare synthetic HZ. The oxidant properties of HZ and HE were evaluated by three different approaches. First, H₂-DCFDA-labelled BMMps were treated for 1h with 5-25 μ g/ml of HE or HZ, concentrations that were selected based on the heme estimated to be released during infection (Sherry et al., 1995; Sullivan et al., 1996). Hydrogen peroxide was used as positive control, and the percentages of high fluorescent cells were determined by flow cytometry.

After 1h treatment, significant levels of ROS were induced by HE when used at 25 μ g/ml, whereas HZ did not generate ROS at the 5-25 μ g/ml range (Fig. 3.1A). As expected, HO-1 protein was detected in Western Blots of lysates from HE- and HZ-conditioned BMMps (10 and 25 μ g/ml) for 4h, whereas a relatively weaker expression was measured in BMMps treated with 25 μ g/ml HZ in comparison with the BMMps treated with 25 μ g/mL HE (Fig. 3.1B).

Intracellular GSH/GSSG ratios were compared in BMMps treated with HZ or HE for 24h, which represents the time point when the cells are stimulated with LPS or IFN γ /LPS for estimation of IL-12 and IL-10 responses. The effect of the antioxidant NAC on GSH/GSSG ratios was also determined. Surprisingly and in contrast to the effects conferred by the GSH depleting agent DEM, increased GSH/GSSG ratios were measured both in HZ and HE-conditioned BMMps when compared to untreated controls, and the effect was significantly accentuated in HE-conditioned BMMps (Fig. 3.1C, $p < 0.001$). Treatment with NAC for 4h increased GSH levels in controls and HZ-treated BMMps, but had no effect on HE-treated cells (Fig. 3.1C). As it has been suggested that priming of LPS-driven IL-12 production by IFN γ is partially dependent on its ability to increase GSH/GSSG ratios in human monocytes (Utsugi et al., 2002), we first confirmed whether this effect occurred in murine BMMps, and further characterized it in BMMps treated with HZ or HE (25 μ g/ml). For this, BMMps were conditioned for 24h with HZ or HE, after

which IFN γ was added for 24 additional hours and intracellular GSH/GSSG ratios were estimated. Interestingly, in response to IFN γ , GSH/GSSG ratios further increased in control cells ($p < 0.05$) but remained unmodified in HZ or HE-conditioned BMMps (Fig. 3.1D).

Taken together, our results indicate that in contrast to HZ, short-term treatment with HE induces oxidative stress; however, following 24h, both compounds significantly up-regulate GSH/GSSG ratios and render pre-conditioned Mps refractory to IFN γ -driven up-regulation of GSH.

Production of IL-12p40 and IL-12p70 is inhibited by hemozoin and haemin in an IL-10-independent manner

At 25 $\mu\text{g/ml}$ (~ 26 nmol/ml heme), ROS and HO-1 were significantly induced by HE, and therefore, this biologically relevant concentration of heme was used in our experiments. BMMps were treated with HZ or HE for 24h, after which the cells were stimulated with LPS or IFN γ /LPS for 24 additional hours, and culture supernatants were assessed for IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 content by ELISA.

In response to LPS, IL-12p40 levels were lower in culture supernatants from HZ ($43 \pm 1\%$ inhibition) and HE-conditioned BMMps ($80 \pm 5\%$ inhibition); a more pronounced inhibition was conferred by HE (Fig. 3.2A). As expected, deficient IL-12p70 responses to LPS were also measured both in HZ ($22.0 \pm 0.4\%$ inhibition) and HE-conditioned BMMps ($59 \pm 6\%$ inhibition) (Fig. 3.2B). When combining IFN γ /LPS as stimuli, although variable levels of IL-12p40 inhibition were induced by HZ ($17 \pm 3\%$, with an average inhibition of $20 \pm 4\%$, representative of 2 independent experiments) and HE ($32 \pm 3\%$, with an average inhibition of $45 \pm 15\%$, representative of 2 independent experiments) (Fig. 3.2C), these contrasted in a reproducible manner with drastic drops in IL-12p70 levels in HZ ($>70\%$, reproduced in 6 different experiments) and HE-conditioned BMMps ($>85\%$, reproduced in 6 different experiments) (Fig. 3.2D).

Interestingly, the IL-12 deficiency was not accompanied by overwhelming IL-10 responses. On the contrary, production of IL-10 was significantly hampered in BMMps treated with HZ ($51 \pm 6\%$ inhibition) or HE ($74 \pm 8\%$ inhibition) when compared to control cells stimulated with LPS; as for IL-12, the inhibition was further accentuated in HE-conditioned BMMps (Fig. 3.3, $p < 0.05$). When IFN γ was used in combination with LPS as stimuli, IL-10 production was reduced in a significant and comparable manner (more than 95% inhibition) both in control as well as in HE

and HZ-conditioned BMMps (data not shown). Results are representative of at least three independent experiments.

IL-10 is the most important physiological inhibitor of IL-12, and in human monocytes HZ has been shown to induce IL-10 and to inhibit IL-12 production (Keller et al., 2006). The impact of IL-10 neutralization was studied both on HE and HZ-conditioned BMMps, and this, albeit the deficient IL-10 responses measured in the cells pre-conditioned with either of these two compounds. For this, BMMps were conditioned with HZ or HE as described previously, after which anti-IL-10 neutralizing mAb was added 15 minutes prior to stimulation with LPS or IFN γ /LPS.

Neutralization of IL-10 improved both IL-12p40 and IL-12p70 secretion in control (15% and 427%, respectively) and HZ-treated cells (36% and 415%, respectively) in response to LPS (Fig. 3.4A, B), but did not modify the relative deficiency conferred by HZ in respect to control cells (Fig. 3.4A,B). Interestingly, the inhibitory effect of HE on IL-12p40 and IL-12p70 was totally insensitive to IL-10 neutralization (Fig. 3.4A, B).

As expected, when IFN γ /LPS was used as stimuli, treatment with anti-IL-10 antibody did not enhance IL-12p70 secretion in control, HZ and HE-conditioned cells (Fig. 3.4C, D), which was suspected, as under these conditions, IL-10 is undetected or produced at very low levels (0-20 pg/ml range) (data not shown).

The inhibition of IL-12p70 and IL-12p40 by hemozoin and haemin is refractory to treatment with NAC.

Since treatment with NAC increased GSH/GSSG ratios in control and HZ-conditioned BMMps, we examined its effects on IL-12p40 and IL-12p70 production. Interestingly, treatment with NAC up-regulated IL-12p40 responses in control BMMps stimulated with LPS, but had no effect in HZ-conditioned BMMps or further inhibited IL-12p40 production in HE-treated cells (Fig. 3.5A). The LPS/IFN γ -driven production of IL-12p40 was not modified by NAC in none of the groups (Fig. 3.5B).

When IFN γ and LPS were combined as stimuli, an important drop in IL-12p70 was induced by NAC in control BMMps (Fig. 3.5C). Interestingly, albeit increased production of IL-12p40 in HZ-conditioned BMMps when stimulated with IFN γ /LPS in the presence of NAC (Fig. 3.5D), an opposite effect was measured in respect to the IL-12p70 heterodimer (Fig. 3.5D). In addition, NAC further accentuated the deficient IL-12p70 response to IFN γ /LPS induced by HE (Fig. 3.5D). Results are representative of two independent experiments.

Inhibition of the p38 MAPK shuts down IL-10 production, enhances IL-12 secretion but fails to restore IL-12 responses in hemozoin and haemin-conditioned BMMps

MKK3-deficient Mps are impaired in their capacity to produce IL-12p40/IL-12p35, suggesting that the MKK3/p38 MAPK pathway is pivotal for IL-12 induction by LPS or IFN γ /LPS (Lu et al., 1999). Surprisingly, Marriott et al (2001) reported increased production of IL-12p40 in human PBMC treated with the p38 MAPK specific inhibitor SB203580 (<10 μ M range) (Marriott et al., 2001); Salmon et al., (2001) further suggested that activation of the p38 MAPK by LPS could have dual effects on IL-12 and IL-10 production : inhibition of p38 MAPK could enhance IL-12 production in conditions associated with robust IL-10 production, by down regulating IL-10 levels (Salmon et al., 2001). In their study, the stimulatory effect of SB203580 on IL-12 was obvious at concentrations lower than 5 μ M, and correlated in a dose-dependent manner with a drop in IL-10 secretion (Salmon et al., 2001).

We studied the effect of the SB203580 on IL-12p40, IL-12p70 and IL-10 secretion in control, HZ and HE-conditioned BMMps. Preliminary experiments in our laboratory revealed impaired (>90% inhibition) IL-12 responses in control cells treated with SB203580 at concentrations higher than 5 μ M. A dose of 1 μ M was then used in our experiments as it led to the most significant drop in IL-10 production in control cells without inhibiting IL-12. BMMps were treated with HZ or HE for 24h after which SB203580 was added 1h prior to stimulation with LPS or IFN γ /LPS. Inhibition of p38 MAPK increased the levels of IL-12p40 in culture supernatants from all groups of BMMps in response to LPS (Fig 3.6A); in HZ and HE-treated BMMps the inhibitor further increased IL-12p40 levels in response to IFN γ /LPS stimulation (Fig. 3.6B). Albeit an important up-regulation of IL-12p40 in HZ and HE-conditioned BMMps, IL-12p70 levels remained significantly low (Fig. 3.6C, D), in opposition to a robust increase in control cells (Fig. 3.6D, $p < 0.001$).

Our data suggests altered responses to IFN γ in HZ and HE-conditioned BMMps that is independent of IL-10. Indeed, inhibition of the p38 MAPK turned down IL-10 responses (Fig. 3.7, $p < 0.001$) and enhanced IL-12p40 responses to IFN γ /LPS in HZ and HE conditioned cells (Fig. 3.8A) but did not restore IL-12p70 production (Fig. 3.8A,B). Taking together, these results suggest that HZ and HE alter the capacity of IFN γ to up-regulate IL-12p70 through a mechanism that seems independent of the transcriptional control of the IL-12p40 subunit by IL-10 or by the p38 MAPK.

3.5 Discussion

In malaria, the severity of anaemia correlates with low levels of IL-12p40/IL-12p70 and increased production of IL-10 (Chaisavaneeeyakorn et al., 2003; Chaiyaroj et al., 2004; Luty et al., 2000; Ong'echa et al., 2008; Wroczynska et al., 2005). HZ has been shown to inhibit NO and TNF- α production through its ability to generate oxidative stress (Taramelli et al., 2000), and its accumulation correlates with overproduction of IL-10 and down-regulation of IL-12p40 secretion in human monocytes (Keller et al., 2006). As IL-12p40 production is significantly impaired by oxidants in Mps, we hypothesized that the inhibitory effect of HZ on IL-12p40 and IL-12p70 production could be sustained by a redox-dependent mechanism leading to IL-10 production. In addition, iron-dependent oxidative stress induces HO-1 expression and activity which further generates biliverdin, free iron and CO, a gas with inhibitory effects on LPS-driven pro-inflammatory cytokines and an inducer of IL-10 in murine Mps (Otterbein et al., 2000).

In respect to the oxidant properties of HZ and HE, our data confirmed the oxidative properties of HE, that is, its capacity to induce ROS (Porto et al., 2007) and activate HO-1 expression (Figueiredo et al., 2007; Schwarzer et al., 1999), which was sustained for more than 24h in our experiments (data not shown). Treatment of BMMps with HZ on the contrary did not generate ROS nor induce HO-1, agreeing with what has been reported for native *P. falciparum* HZ in human monocytes (Schwarzer et al., 1999). Interestingly, independently of the contrasting oxidant properties of HZ and HE, a significant increase in cellular GSH/GSSG ratios was measured in BMMps after 24h treatment with either of the two compounds. That is, at the time point of stimulation with LPS or IFN γ /LPS, HZ/HE-conditioned BMMps had high levels of reduced GSH. In this context, priming of IL-12p40 and IL-12p70 responses by IFN γ has been shown to rely at least partially on the cytokine's capacity to increase GSH/GSSG ratios. Surprisingly, the elevated GSH levels in HZ and HE-conditioned BMMps were not further increased in response to IFN γ , suggesting a "buffering control" of GSH levels in Mps. This effect correlated with defective induction of IL-12p70 by IFN γ /LPS, suggesting that elevated GSH/GSSG ratios may hamper this response. In this respect, although not affecting IL-12p40 production, high levels of thiols may interfere with the formation of the IL-12p70 disulfide-linked heterodimer, as has been demonstrated in IFN γ -primed THP-1 cells treated with NAC or GSH prior to stimulation with LPS (Mazzeo et al., 2002). To our knowledge, our study is the first to reveal a comparable effect induced by an oxidant as HE.

Experiments with anti-IL-10 neutralising antibody or with a p38 MAPK specific inhibitor revealed discrepancies between effects associated to HZ and HE on IL-12p40 and IL-12p70 responses to LPS with those induced when IFN γ was used as a stimuli. Although low IL-10 responses were measured in HZ-conditioned BMMps, neutralization with anti-IL-10 antibody significantly increased IL-12p40 and IL-12p70 production in response to LPS but failed to restore the IL-12p70 response to IFN γ /LPS. Comparatively, treatment with HE affected more drastically IL-10 production, and its inhibitory effects on IL-12p40 and IL-12p70 were as we expected insensitive to IL-10 neutralization. This discrepancy suggests distinct mechanisms of action for HE and HZ, at least in respect to regulation of the IL-12p40 subunit. Nevertheless, when the p38 MAPK inhibitor was used, despite enhancement of IL-12p40 responses to LPS in all experimental groups, or IL-12p40 responses to IFN γ /LPS in HZ and HE-treated BMMps, IL-12p70 responses to IFN γ /LPS remained significantly low. These results further confirm that HZ and HE alter the capacity of BMMps to produce more IL-12p70 in response to IFN γ and the mechanism seems indeed independent of the transcriptional control of IL-12p40 subunit through IL-10/p38 MAPK signalling. In this context, our results agree with those described for human monocytes, in which treatment with GSH-OEt or with DEM resulted respectively in a significant up regulation or inhibition of IL-12p40 and IL-12p70 secretion in response to LPS (Utsugi et al., 2002). However, our results are greatly in contrast with restoration of the IL-12p70 response measured in DEM-treated human monocytes stimulated with IFN γ /LPS in presence of GSH-OEt, suggesting either a different behaviour of murine BMMps or a different effect exerted by HZ and HE to the one described for DEM. Indeed, we measured comparable inhibitory effects in BMMps treated with the oxidant DEM : low cellular GSH/GSSG ratios hampered both production of IL-10 in response to LPS and production of IL-12p70 in response to IFN γ /LPS, but the inhibition was strongly reverted by NAC (data not shown).

All together, in this study we have shown that despite the fact that synthetic HZ is a polymer of heme, this component seems to be less reactive than its counterpart HE. Indeed, whereas both components inhibit IL-12p40 and IL-12p70 production through an IL-10/p38 MAPK-independent mechanism that may involve the upregulation of reduced glutathione, the effect of HE on BMMps tends to be more pronounced. In the same direction, HE-conditioned BMMps led to a more important induction of HO-1 than that of HZ. Furthermore, in contrast to HZ, HE was shown to be a potent inducer of ROS. Interestingly, the inhibition of the p38 MAP kinase led to a significant drop in IL-10 production and enhanced IL-12p70 secretion in control and HZ-treated

BMMps, but failed to rescue the deficient IL-12p70 response to IFN γ and LPS in HZ and HE-conditioned BMMps. However, albeit that the inhibitory effects of HZ and HE on IL-12p70 production were refractory to treatment with NAC, increased GSH/GSSG ratios were measured in BMMps treated with HZ and HE for 24 hours, and in those cells, IFN γ failed to further upregulate the GSH/GSSG ratios, an effect that did occur in control cells.

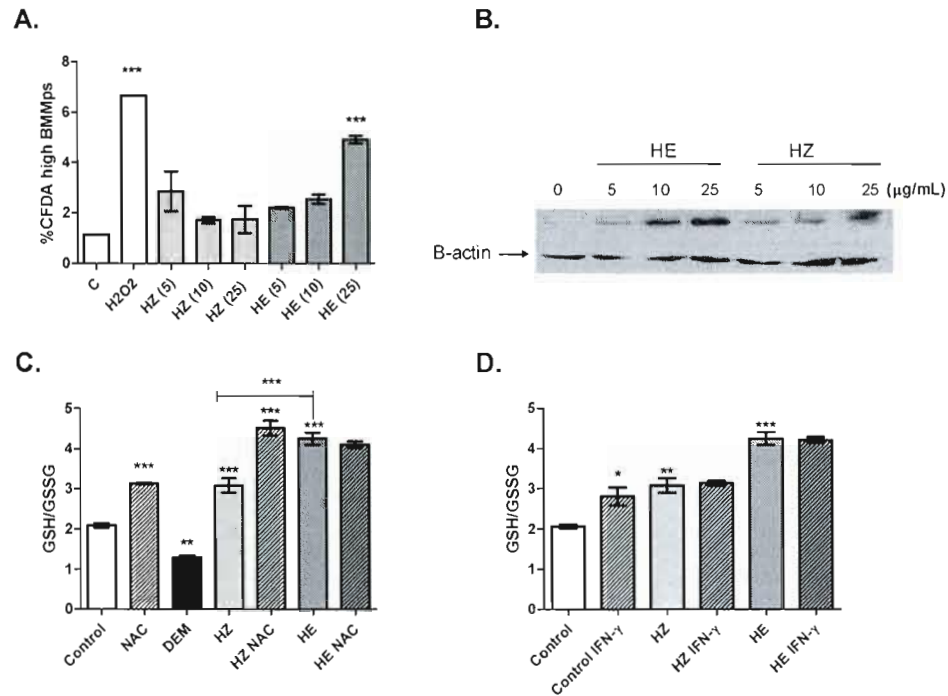


Figure 3.1: A. Level of ROS production in BMMps induced by HZ or HE. BMMps (1×10^6 cells/tube) were stained with H₂-DCFDA probe, treated for 1h with either HZ or HE (5, 10 or 25 µg/mL) and the mean fluorescence was read in a FACscan cytofluorometer. **B. HO-1 expression induced by HZ or HE.** BMMps (5×10^5 cells/well) were treated for 4h with different concentrations of HZ or HE (5, 10 or 25 µg/mL) after which the cells were lysed in Laemmli buffer and the level of HO-1 expression was determined by Western Blot. **C. GSH/GSSG ratio in BMMps following treatment with NAC, DEM, HZ, HE or a combination of the above.** BMMps (5×10^5 cells/well) were treated with DEM (25 µM, 4 hours), HZ or HE (25 µg/mL, 24 hours), and further cultured with or without NAC (0,25mM, 24 hours). Cells lysates were obtained by sonication and were deproteinized before the assessment of their intracellular levels of total GSH and oxidized GSH (GSSG). **D. GSH/GSSG ratio in BMMps following treatment with HZ, HE, IFN γ or a combination of HZ/HE and IFN γ .** BMMps (5×10^5 cells/well) were treated or not with HZ or HE (25 µg/mL, 24 hours), and further cultured with or without IFN γ (50U/mL, 24 hours). Cell lysates were obtained by sonication and were deproteinized before the assessment of their intracellular levels of total GSH and oxidized GSH (GSSG). Results are representative of three independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates.

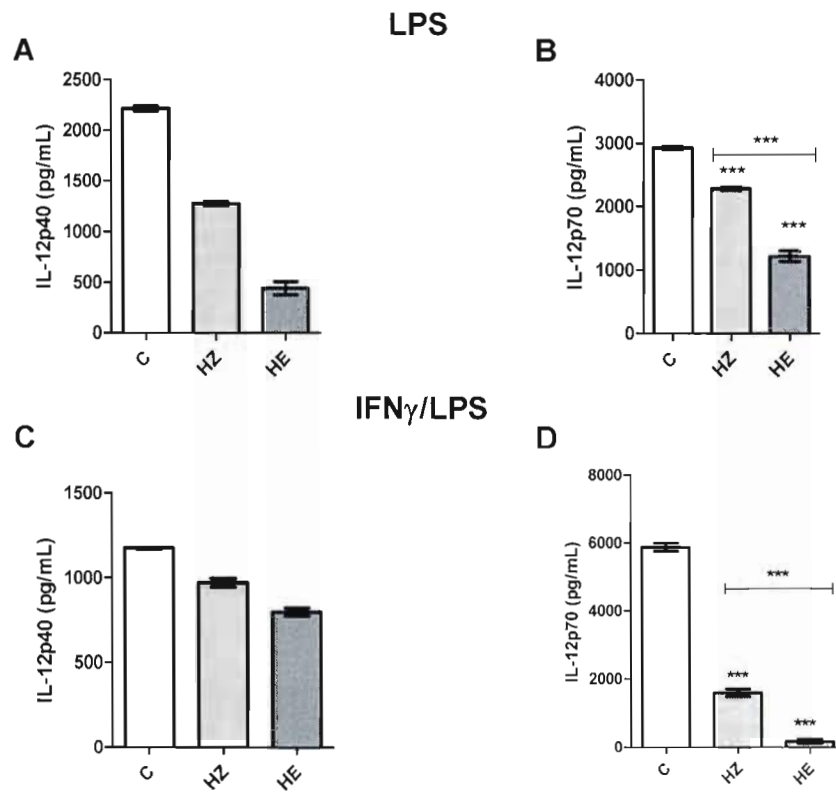


Figure 3.2: Inhibition of IL-12p40 and IL-12p70 production by HZ and HE in BMMps. BMMps (5×10^4 cells/well) were treated with HZ or HE (25 μ g/mL) for 24 hours before stimulation for IL-12 production (24 hours) by LPS (50 ng/mL) (A, B) or following priming with IFN γ (50 U/mL) 15 minutes prior to LPS treatment (C, D). Culture supernatants were harvested and assessed for their IL-12p40 (A, C, results are representative of two independent experiments, and represents mean values \pm SEM from triplicates) or IL-12p70 (B, D, results are representative of six independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates) content by ELISA.

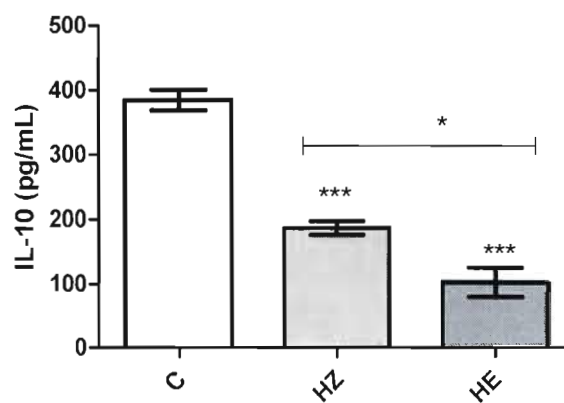


Figure 3.3: IL-10 production by HZ or HE-conditioned BMMps. BMMps (5×10^4 cells/well) were treated with HZ or HE (25 μ g/mL) for 24 hours prior to LPS treatment (50 ng/mL) for 24 hours. Culture supernatants were harvested and assessed for their IL-10 content by ELISA. Results are representative of three independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates.

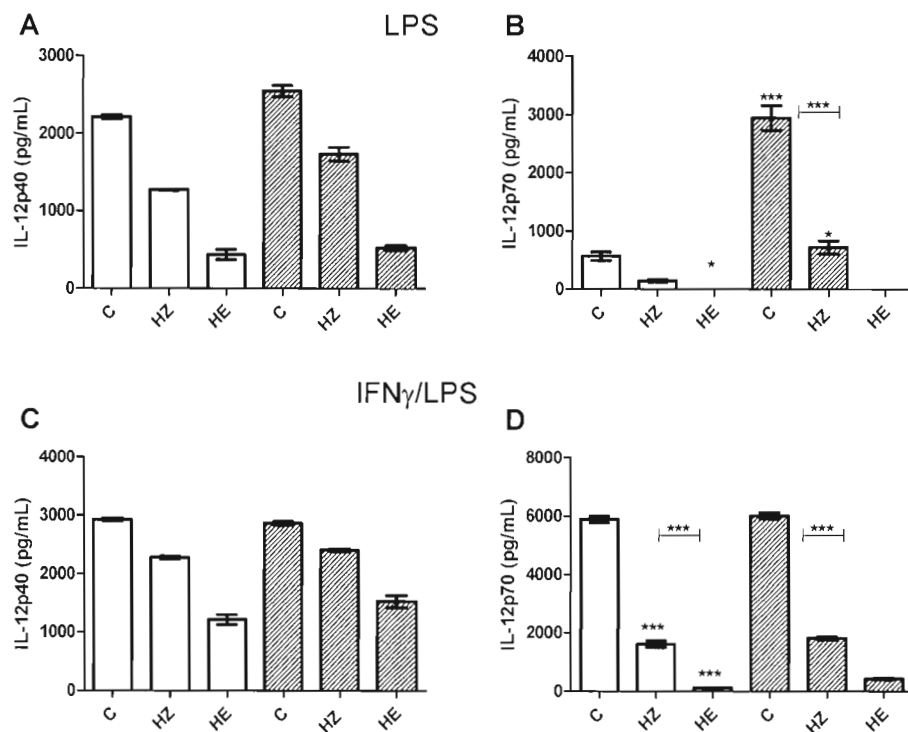


Figure 3.4: Impact of IL-10 neutralization on IL-12 responses. BMMps (5×10^4 cells/well) were treated with HZ or HE ($25 \mu\text{g/mL}$) for 24 hours prior to stimulation for IL-12 production (24 hours) by LPS (50 ng/mL) (A, B) or following priming with IFN γ (50 U/mL) 15 minutes before LPS treatment (C, D). Fifteen minutes before the stimulation with LPS or IFN γ /LPS, an anti-IL-10 neutralizing antibody ($1 \mu\text{g/mL}$, dashed bars) was added in the culture medium. Culture supernatants were harvested and assessed for their IL-12p40 (A, C, results are representative of two independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates) or IL-12p70 (B, D, results are representative of three independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates) content by ELISA.

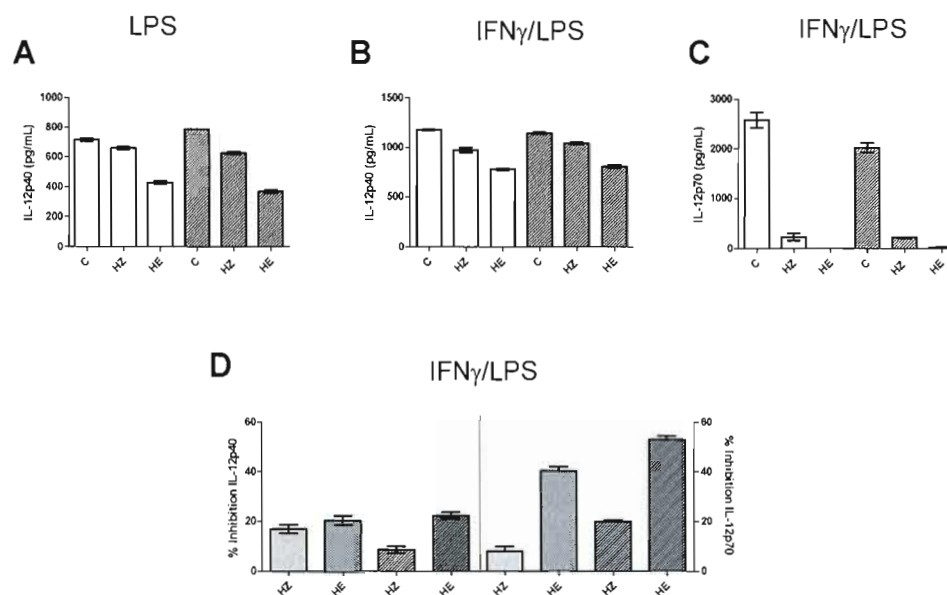


Figure 3.5: Inhibition of IL-12 production by HZ and HE is refractory to treatment with NAC. BMMps (5×10^4 cells/well) were treated with HZ or HE ($25 \mu\text{g/mL}$) for 24 hours before stimulation for IL-12 production (24 hours) by LPS (50 ng/mL) (A) or following priming with IFN γ (50 U/mL) 15 minutes prior to LPS treatment (B, C, D). The stimulation was either carried in the presence or absence of NAC (0.25 mM , dashed bars), which was added 15 minutes prior to the stimulation. Culture supernatants were harvested and assessed for their IL-12p40 (A, B) or IL-12p70 (C) content by ELISA. D. Inhibition of IL-12p40 and IL-12p70 production by HZ or HE and the impact of the reducing agent NAC (dashed bars) on this inhibition. Results are representative of two independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates.

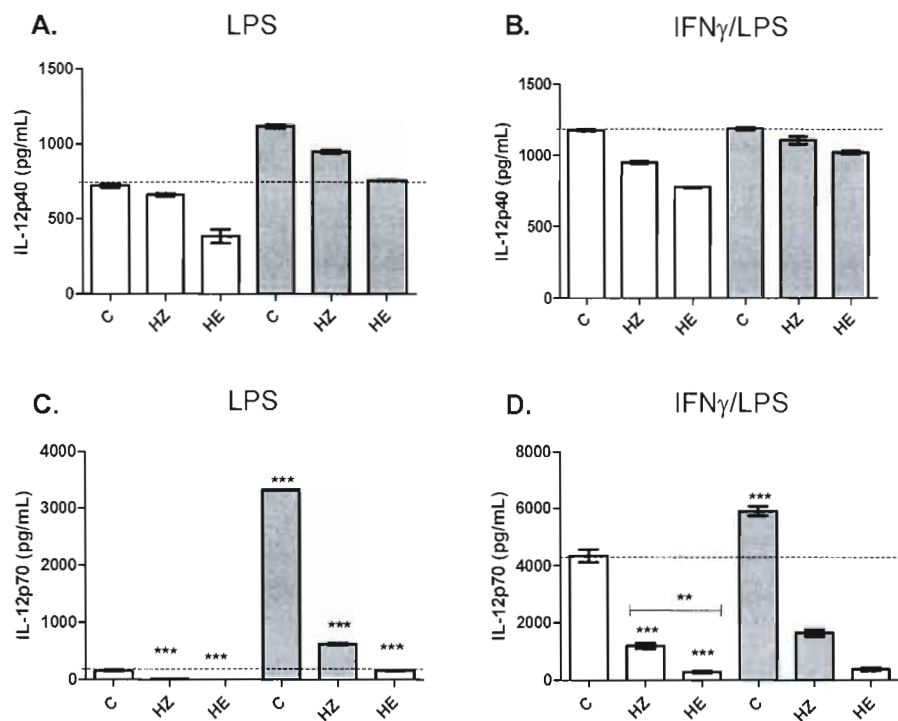


Figure 3.6: Effect of a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580) on the IL-12 responses. BMMps (5×10^4 cells/well) were treated with HZ or HE ($25 \mu\text{g/mL}$) for 24 hours before stimulation for the IL-12 production (24 hours) by LPS (50 ng/mL) (A, C) or by priming with IFN γ (50 U/mL) 15 minutes before LPS treatment (B, D). One hour before the stimulation, a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580, $1 \mu\text{M}$) was added (dashed bars) in the culture medium. Culture supernatants were harvested and assessed for their IL-12p40 (A, B) or IL-12p70 (C, D) content by ELISA. Results are representative of three independent experiments for the IL-12p70 values and of two independent experiments for the IL-12p40 values and represent mean values \pm SEM from triplicates.

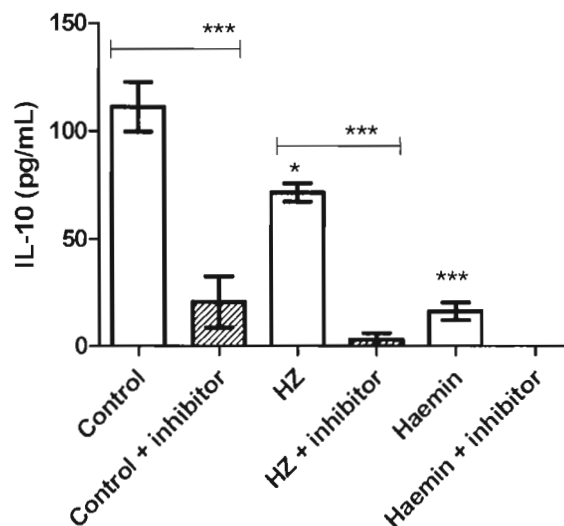


Figure 3.7: Effect of a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580) on the IL-10 response. BMMps (5×10^4 cells/well) were treated with HZ or HE ($25 \mu\text{g/mL}$) for 24 hours before LPS treatment (50 ng/mL , 24 hours). One hour prior to LPS addition, a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580, $1 \mu\text{M}$) was added (dashed bars) in the culture medium. Culture supernatants were harvested and assessed for their IL-10 content by ELISA. Results are representative of three independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates.

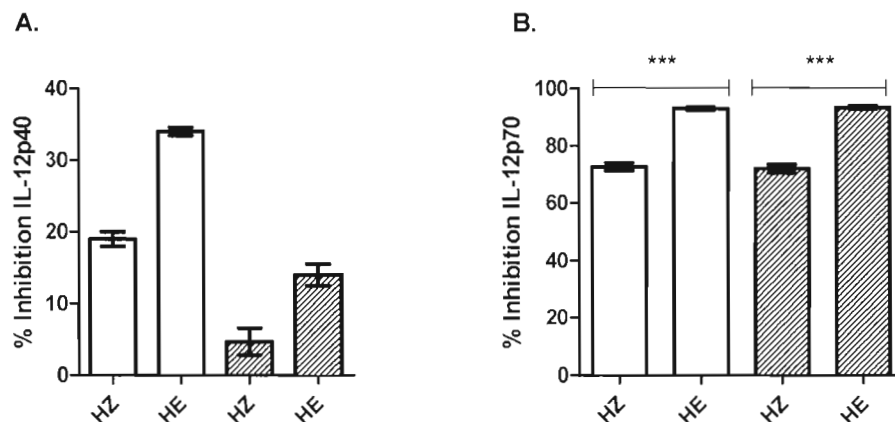


Figure 3.8: IL-12p40 and IL-12p70 inhibition in response to a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580). BMMps (5×10^4 cells/well) were treated with HZ or HE (25 μ g/mL) for 24 hours before stimulation for the IL-12 production (24 hours) by priming with IFN γ (50U/mL) 15 minutes before LPS treatment (50ng/mL). One hour before the stimulation, a selective inhibitor of the p38 MAPK (SB203580, 1 μ M) was added (dashed bars) in the culture medium. Culture supernatants were harvested and assessed for their IL-12p40 (A, results are representative of two independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates) or IL-12p70 (B, results are representative of three independent experiments, and represent mean values \pm SEM from triplicates) content by ELISA and the level of inhibition in comparison to the control was evaluated.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

Après avoir comparé l'effet de l'HZ à celui d'un agent oxydant riche en fer sur les BMMps, il nous semblait intéressant de comparer cet effet à celui d'un agent oxydant classique dépourvu de composant ferrique : le diéthyl maléate (DEM). À cette fin, l'impact d'un traitement de BMMps par le DEM a été évalué au niveau du GSH intracellulaire, de la production d'EROs, de la production d'IL-12p70 et d'IL-10 ainsi que l'effet de l'ajout d'inhibiteurs de voies de signalisation impliquées dans la production d'IL-12 sur la fonction des BMMps.

La variabilité des niveaux absolus de production d'IL-12p40, IL-12p70 et IL-10 des témoins cellulaires au sein des différentes expériences peut s'expliquer par le fait que les cellules utilisées provenaient de spécimens vivants distincts chez lesquels des cellules étaient prélevées et différenciées avant utilisation subséquente. Afin de contrer cette variabilité des niveaux absolus, l'évaluation des résultats des divers traitements était toujours effectuée en comparaison au témoin cellulaire de l'expérience en cours.

4.1 Comparaison de l'effet de l'HZ et de l'agent oxydant DEM sur la fonction des BMMps murins.

Les effets des agents oxydants biologiques ainsi que chimiques sur la réponse immunitaire ont été largement étudiés ; lorsque présents à des niveaux physiologiques, ces agents induisent une oxydation localisée amenant aux changements cellulaires qui sont importants au sein du contrôle et de la signalisation redox (Hansen et al., 2006). Or, des doses trop élevées de ces agents causent une oxydation générale (Hansen et al., 2006) pouvant mener à la mort cellulaire (Nguyen et al., 2003).

4.1.1 Effet du DEM sur le GSH intracellulaire des BMMps.

Lors d'un stress oxydatif, les macromolécules cellulaires ainsi que les fonctions cellulaires sont protégées par une oxydation préférentielle du GSH réduit en GSSG (Kaur et al., 2006). Le DEM,

de par sa nature électrophile, bloque la fonction du GSH en alkylant le groupe sulfhydryle de ce dernier et semble ainsi participer à la génération d'un stress oxydatif (Kaur et al., 2006).

Par l'expérience présentée en la Figure 4.1, nous voulions tout d'abord évaluer si un traitement de 4h des BMMps par le DEM (25 μ M) affectait les niveaux intracellulaires de GSH. Puisque le NAC est un précurseur de la synthèse du GSH et qu'il a été largement décrit comme étant capable d'augmenter le ratio intracellulaire GSH/GSSG, celui-ci a été utilisé comme témoin positif. L'on remarque qu'un traitement de 4 heures par DEM (25 μ M) chez les BMMps mène à une diminution du niveau intracellulaire de GSH total (Figure 4.1A) et ce, en diminuant le ratio GSH/GSSG (Figure 4.1D) par la diminution du GSH réduit (Figure 4.1B) puisqu'aucune différence significative n'a été observée au niveau du GSSG (Figure 4.1C). Ainsi, cette concentration et cette durée de traitement par DEM, utilisées pour les expériences subséquentes, engendrent une différence significative au niveau du statut redox des cellules.

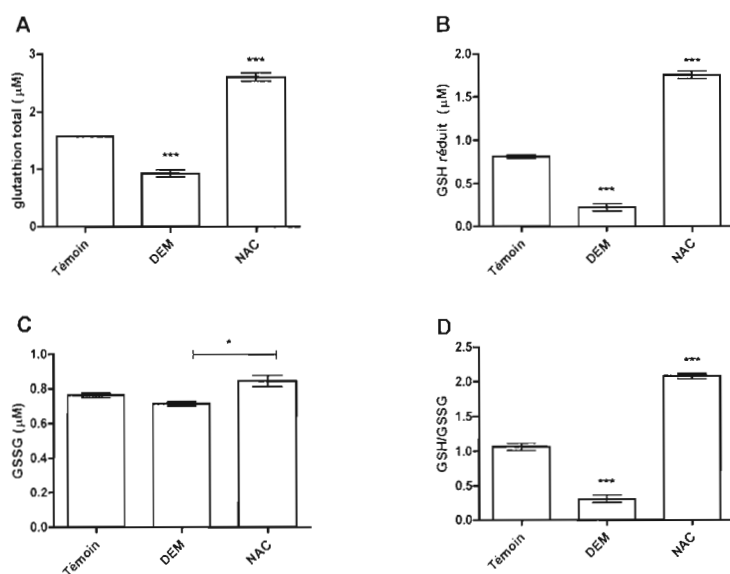


Figure 4.1 : Niveaux de glutathion A) total, B) réduit, C) oxydé et D) ratio GSH/GSSG de lysats cellulaires de BMMps murins suite à un traitement par du NAC ou du DEM. Des BMMps (5×10^5 cellules/puits) ont été traités pendant 4h avec du NAC (0.25mM) ou du DEM (25 μ M). Les lysats cellulaires ont été obtenus par sonication puis ont été déprotéinés avant les dosages pour le GSH total ou oxydé (GSSG) qui ont été effectués à l'aide de la trousse «Glutathione Assay Kit» de Cayman Chemical. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

4.1.2 Le DEM n'est pas un fort inducteur de la production d'EROs chez les BMMps murins.

Les agents oxydants, tel le DEM, ont été décrits comme étant de forts inducteurs de stress oxydatif. De plus, il a été largement démontré que la déplétion du GSH intracellulaire mène à la formation d'EROs puisque ce tri-peptide est le principal tampon redox intracellulaire (Haddad et Harb, 2005). Or, la déplétion du GSH en soi ne semble pas être responsable des grandes augmentations d'EROs et de la peroxydation des lipides (Tirmenstein et al., 2000). Le mécanisme d'action du DEM implique la déplétion du GSH intracellulaire (Figure 4.1) mais d'après les résultats présentés à la Figure 4.2, cette déplétion ne semble pas induire d'EROs chez les BMMps contrairement au H_2O_2 (0,5mM; témoin positif) qui a augmenté de façon significative la fluorescence moyenne de la sonde fluorescente H_2 -DCFDA après une heure de traitement (Figure 4.2). En effet, cette sonde est non fluorescente jusqu'à ce que ses groupements acétates soient clivés par les estérases intracellulaires et qu'une oxydation se produise à même la cellule (Invitrogen, Molecular Probe).

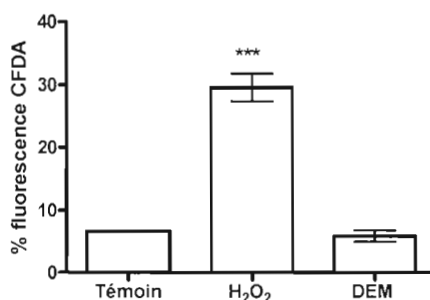


Figure 4.2 : Production d'EROs par les BMMps murins suite à un traitement avec des agents oxydants. Les BMMps (5×10^5 cellules/tube) ont été marqués avec la sonde H_2 -DCFDA (100 μ M) puis traités avec du DEM (25 μ M) ou avec du H_2O_2 (0.5mM, témoin positif) pendant 1h avant d'être analysés par cytométrie de flux. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

4.1.3 Le DEM et l'HZ synthétique inhibent la production d'IL-12p70 chez les BMMps suite à une stimulation par IFN γ et LPS de manière IL-10 indépendante.

Puisqu'il a précédemment été suggéré que les CPAs «oxydées» produisent moins d'IL-12 et que les CPAs «réduites» en produisent davantage, nous tenions à comparer l'effet d'un agent oxydant classique, tel le DEM (à une durée et concentration diminuant le ratio intracellulaire GSH/GSSG) avec celui de l'HZ, au niveau de la production de cette cytokine, suite à une stimulation par IFN γ et LPS. Un traitement par le DEM (25 μ M, 4h) inhibe la production d'IL-12p70 par les BMMps (Figure 4.3A), tout comme le traitement par l'HZ (25 μ g/mL, 24h) avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 27,9% et 56,7% par rapport au témoin cellulaire. Cette inhibition ne semble pas associée à une augmentation de la production d'IL-10 et ce, pour les deux différents traitements (DEM ou HZ) (Figure 4.3B).

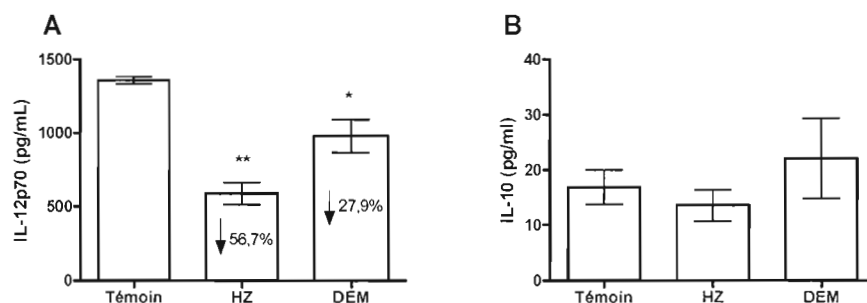


Figure 4.3 : Production A) d'IL-12p70 et B) d'IL-10 par des BMMps prétraités avec de l'HZ (25 μ g/mL) pendant 24 heures ou par du DEM (25 μ M) pendant 4 heures suite à une stimulation par LPS (50ng/mL) et IFN γ (50U/mL) de 24 heures. Les surnageants ont été récupérés puis dosés pour leur contenu en IL-12p70 et IL-10 par ELISA. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

4.1.4 Restauration de la production d'IL-12p70 par le NAC chez les BMMps prétraités avec du DEM.

Tel que démontré à la figure précédente, le traitement par DEM inhibe la production d'IL-12p70 suite à une stimulation par du LPS et de l'IFN γ . Or, il a préalablement été proposé que l'inhibition de la production de cytokines suite à un traitement avec de l'HZ pouvait être liée au stress oxydatif induit par le pigment puisque des composés riches en thiols avaient la capacité de restaurer partiellement les fonctions de ces Mps (Taramelli et al., 2000). Cependant, dans le chapitre 3 de notre étude, nous montrons que l'inhibition de l'IL-12 induite par l'HZ et l'HE est réfractaire à l'ajout des composés réducteurs thiolés. Ainsi, nous voulions confirmer que l'inhibition d'IL-12p70 induite par le DEM, agent dépléteur du GSH et dépourvu de fer, pouvait être restaurée par l'ajout de NAC exogène. En effet, l'on voit qu'une addition exogène de NAC durant la stimulation par IFN γ /LPS suite à un traitement par le DEM restaurait la production d'IL-12p70 au niveau du témoin cellulaire (Figure 4.4).

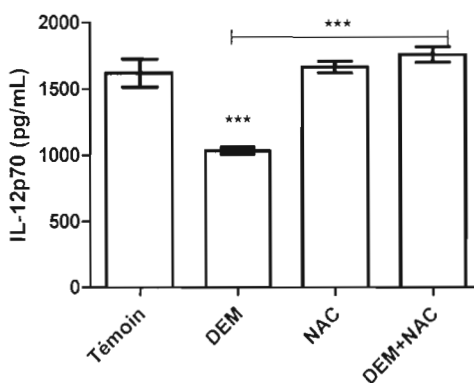


Figure 4.4 : Effet d'une stimulation par IFN γ /LPS en présence ou absence de NAC sur la production d'IL-12p70 par des BMMps prétraités avec du DEM. Des BMMps (5×10^4 cellules/puits) ont été traités pendant 4 heures avec du DEM puis stimulés pendant 24 heures par IFN γ (50U/mL, 15 minutes avant l'ajout de LPS) et LPS (50ng/mL) en présence ou absence de NAC (0,25mM, ajouté 15 minutes avant la stimulation par IFN γ /LPS). Les surnageants ont été récupérés puis dosés pour leur contenu en IL-12p70 par ELISA. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

4.2 Effet de l'ajout d'inhibiteurs de voies de signalisation impliquées dans la production d'IL-12 sur la fonction des BMMps.

La production d'IL-12 implique l'action coordonnée de multiples voies de signalisation incluant entre autre celles de NFκB et des MAPKs p38 (Kang et al., 2005), ERK (Feng et al., 1999) et JNK (Utsugi et al., 2003).

Une première stratégie qui aide à prédéterminer la voie par laquelle l'inhibition de la production d'IL-12 par l'HZ se produit consiste à comparer les effets des inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans la production d'IL-12 chez des BMMps témoins ou traités avec de l'HZ. D'autre part, cette approche permet d'évaluer les contributions des différentes kinases dans la sécrétion d'IL-12 et d'IL-10 en réponse au LPS chez le modèle étudié (BMMps murins). Les résultats présentés ci-dessous sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

4.2.1 Effet d'un inhibiteur de la voie de NFκB sur la production de cytokines par les BMMps suite à une stimulation par LPS ou par IFNγ/LPS.

L'activation de NFκB mène à l'induction de la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires induite par LPS (Utsugi et al., 2003) ainsi qu'à l'expression des sous unités p40 et p35 de l'IL-12 (Obata et al., 2006).

Ainsi, le premier inhibiteur étudié en est un sélectif de NFκB : le CAPE (Caffeic acid phenethyl ester). Ce dernier a été utilisé à 10 ou 20μM. Lorsque du LPS était utilisé en tant que seul moyen de stimulation, aucune production d'IL-12p70 ou d'IL-10 n'était détectée par les BMMps (prétraités ou non avec de l'HZ) en présence de cet inhibiteur (Figures 4.5A et 4.5B). Alors qu'un lien direct existe entre l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de NFκB et la production d'IL-12, aucun n'est à présent établi entre ce facteur de transcription et l'induction d'IL-10 (Zhang et al., 2005). En effet, malgré que ce facteur de transcription soit un régulateur important des gènes des cytokines pro-inflammatoires, il ne semble pas être directement impliqué dans la régulation de l'IL-10 (Bondeson et al., 1999). L'inhibition d'IL-10 en réponse au LPS en présence de cet inhibiteur pourrait être attribuée au fait que l'inhibition de NFκB par un inhibiteur spécifique (tel le CAPE) diminue l'activité de la HO-1 (Wijayanti et al., 2004). En effet, lors de réactions enzymatiques, cette enzyme génère entre autres du monoxyde de carbone qui est un puissant inducteur d'IL-10 (Lee et Chau, 2002). Ainsi, il se pourrait qu'en bloquant l'activité de cette enzyme, la production subséquente d'IL-10 soit inhibée. Or, lorsqu'une pré-stimulation par de l'IFNγ était effectuée 15 minutes avant l'addition du LPS, une inhibition dose-dépendante

d'IL-12p70 par CAPE était observée ; une inhibition qui semblait plus prononcée chez les BMMps prétraités avec de l'HZ (Figure 4.5C). En effet, les pourcentages d'inhibition de la production d'IL-12p70 induite par CAPE chez les BMMps témoins étaient de 60% (CAPE 10 μ M) et de 93% (CAPE 20 μ M) alors que ceux des BMMps traitées avec de l'HZ étaient de 88% (CAPE 10 μ M) et 99% (CAPE 20 μ M). Cette inhibition d'IL-12p70 par CAPE ne semble pas associée à une augmentation de la production d'IL-10 puisque aucune IL-10 ne fut détectée en présence d'IFN γ et ce pour les différentes concentrations de CAPE testées (Figure 4.5D). Les effets de l'inhibiteur étaient comparables chez des BMMps traités avec l'HZ et les témoins cellulaires.

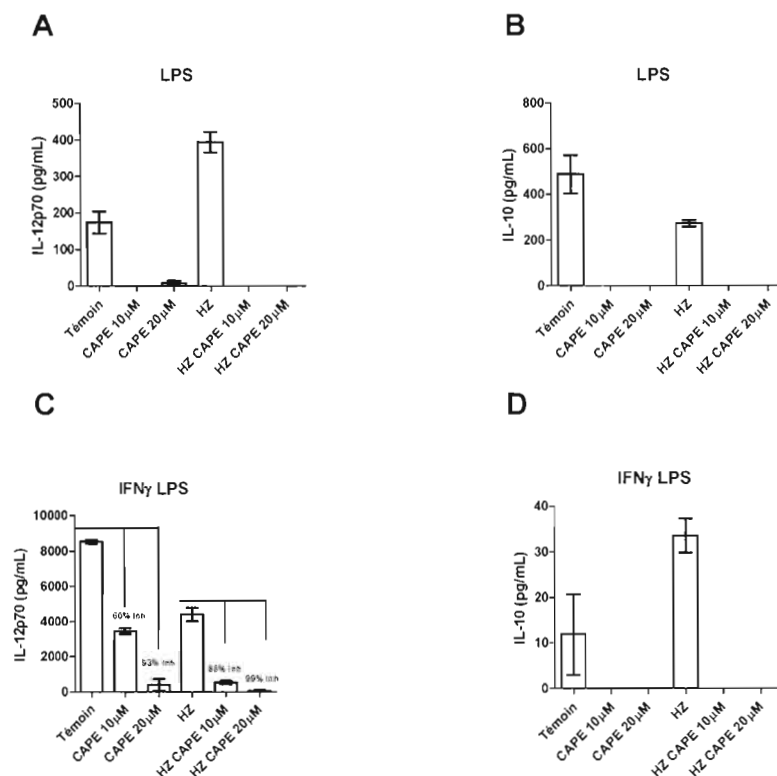


Figure 4.5 : Effet d'un inhibiteur de NF κ B (CAPE) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 par des BMMps murins. Des BMMps (5×10^4 cellules/puits) ont été prétraités ou non avec de l'HZ (25 μ g/mL) pendant 24 heures. Une heure avant la stimulation par LPS (50ng/mL, 4.5A et 4.5B) ou LPS et IFN γ (50U/mL, 4.5C et 4.5D), du CAPE (10 ou 20 μ M) a été ajouté au milieu de culture. Les surnageants ont été récupérés puis dosés pour leur contenu en IL-12p70 (Fig. 4.5A et 4.5C) et en IL-10 (Fig. 4.5B et 4.5D) par ELISA. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

4.2.2 Effet d'un inhibiteur de la voie de JNK sur la production de cytokines par les BMMps (prétraités avec de l'HZ) suite à une stimulation par LPS ou par IFN γ /LPS.

La production d'IL-12 induite par le LPS est négativement régulée par la MAPK JNK (Utsugi et al., 2003). Le SP600125, un inhibiteur spécifique de JNK1, JNK2 et JNK3, a été associé à une suppression de la phosphorylation de c-Jun induite par LPS (qui est activé et phosphorylé par JNK) (Utsugi et al., 2003). Dans la même direction, cet inhibiteur augmente la production d'IL-12p40 par des Mps humains suite à une stimulation par LPS tout comme il en est le cas pour les monocytes humains au niveau de la production d'IL-12p70 (Utsugi et al., 2003).

Ainsi, le second inhibiteur étudié au niveau de la production des IL-12 et IL-10 par les BMMps prétraités ou non avec de l'HZ a été le SP600125. Alors que JNK a été décrit comme régulant négativement la production d'IL-12 suite à une stimulation par LPS (IL-12p40 chez les Mps humains et IL-12p70 chez les monocytes humains), nos résultats semblent indiquer le contraire en ce qui a trait aux BMMps murins. En effet, suite à une stimulation par LPS, une concentration de 10 μ M de SP600125 engendre, chez les BMMps prétraités avec HZ, un niveau d'IL-12p70 comparable aux cellules «témoins HZ» en absence d'inhibiteur, contrairement au témoin cellulaire chez lequel une tendance inhibitrice est observée (Figure 4.6A). Chez le témoin cellulaire ainsi que chez les BMMps prétraités avec de l'HZ, la production d'IL-10 suite à une stimulation par LPS a été inhibée par 10 μ M de SP600125. Les cellules prétraitées avec de l'HZ semblent cependant plus sensibles à cet inhibiteur en ce qui a trait à la production d'IL-10 par rapport aux cellules témoins en raison de leur pourcentage respectif d'inhibition d'IL-10 de 61 \pm 2% et de 33 \pm 8% (Figure 4.6B). Or, l'ajout de cet inhibiteur combiné à une stimulation par LPS et IFN γ mène à une augmentation de la production d'IL-12p70 chez les témoins cellulaires ainsi que chez les BMMps «témoins HZ» (HZ en absence d'inhibiteur) (Figure 4.6C). L'addition de cet inhibiteur augmente d'approximativement 1,6 \pm 0,03 fois la production d'IL-12p70 par rapport au témoin cellulaire stimulé par IFN γ et LPS. Quant aux cellules «témoins HZ», l'addition de SP600125 augmente la production d'IL-12p70 de 2,7 \pm 0,5 fois par rapport à celle en absence d'inhibiteur, ce qui pourrait nous porter à croire que les BMMps «témoins HZ» sont davantage sensibles au blocage de cette voie que les témoins cellulaires puisque l'augmentation de la production d'IL-12p70 est beaucoup plus importante chez celles-ci que chez le témoin cellulaire. De plus, à une concentration de 10 μ M, l'inhibiteur a restauré la production d'IL-12p70 chez les cellules prétraitées avec de l'HZ au niveau du témoin cellulaire en absence d'inhibiteur, ce qui pourrait signifier que l'HZ en soi augmente l'activation de JNK ; ainsi, en bloquant l'activation de

cette MAPK, l'inhibition de la production d'IL-12p70 pourrait être atténuée. En ce qui a trait à la production d'IL-10 en présence d'une stimulation par LPS et IFN γ , le niveau de cette cytokine était faible pour toutes les conditions évaluées et les écart-types étant plus imposants, ces résultats n'ont pas été considérés (données non présentées).

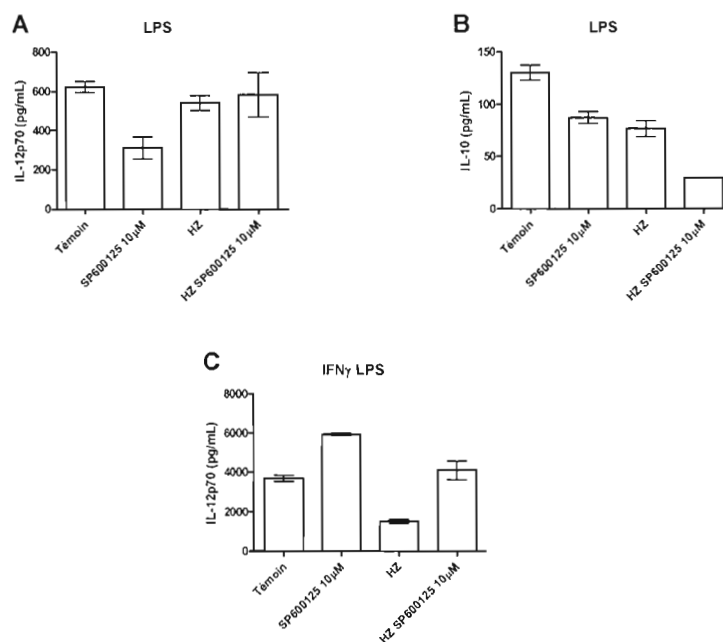


Figure 4.6 : Effet d'un inhibiteur de JNK (SP600125) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 par des BMMps murins. Des BMMps (5×10^4 cellules/puits) ont été prétraités ou non avec de l'HZ (25 μ g/mL) pendant 24 heures. Une heure avant la stimulation par LPS (50 ng/mL, Fig. 4.6A et 4.6B) ou LPS et IFN γ (50 U/mL, Fig. 4.6C), du SP600125 (10 μ M) a été ajouté au milieu de culture. Les surnageants ont été récupérés puis dosés pour leur contenu en IL-12p70 (Fig. 4.6 A et 4.6C) et IL-10 (Fig. 4.6B) par ELISA. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

4.2.3 Effet d'un inhibiteur de la voie de ERK sur la production de cytokines par les BMMps (prétraités avec de l'HZ) suite à une stimulation par LPS ou par IFN γ /LPS.

La MAPK ERK est activée entre autres en réponse au stress oxydatif (Agrawal et al., 2006). L'activation de cette MAPK est importante pour la régulation de la production de cytokines par les CPAs de même que dans la polarisation de la réponse immunitaire des cellules T auxiliaires (T_H1 versus T_H2) (Agrawal et al., 2003; Dillon et al., 2004; Zhang et al., 2004). En effet, les souris ERK1^{-/-} ont une réponse immunitaire de type T_H1 favorisée par l'augmentation de la production d'IL-12p70 ainsi que par la diminution d'IL-10 (Agrawal et al., 2006). Dans la même direction, il a été suggéré par Feng et al. (1999) que ERK régulait négativement la production d'IL-12p40 induite par LPS chez les Mps (Feng et al., 1999). De plus, Jaramillo et collaborateurs (2003) ont rapporté que l'HZ induisait la phosphorylation d'ERK1/2. Ainsi, il semblait intéressant d'évaluer si l'ajout d'un inhibiteur de cette kinase chez les BMMps traités avec de l'HZ engendrait une différence au niveau de la production des cytokines IL-12p70 et IL-10 en comparaison au témoin cellulaire. À cette fin, nous avons utilisé un inhibiteur de cette kinase : l'Apigénine. Contrairement à ce à quoi l'on s'attendait, l'ajout de cet inhibiteur, suivit d'une stimulation par LPS (Figure 4.7A et 4.7C) ou par IFN γ et LPS (Figure 4.7B) inhibait totalement la production d'IL-12p70 (Figure 4.7A et 4.7B) et d'IL-10 (Figure 4.7C) et ce chez les cellules témoins ainsi que chez les cellules prétraitées avec de l'HZ. Une stimulation par IFN γ et LPS annulait toute production d'IL-10 (données non présentées). Or, l'Apigénine n'est pas un inhibiteur «sélectif» de ERK contrairement aux inhibiteurs U0126 et PD98059. U0126 est un inhibiteur de MEK1/2 actif et inactif (Promega); le MEK activé étant responsable de la phosphorylation et de l'activation de la MAPK ERK 1/2 ((Mallon et al., 2004). Le PD98059, quant à lui, inhibe l'activation du MEK 1/2 inactif, empêchant ainsi l'activation de la MAPK ERK (Promega). En effet, l'Apigénine est un flavonoïde, un composant répertorié comme étant un puissant facteur anti-inflammatoire possédant une variété d'effets imprévisibles au sein de ses interactions (Soares et Azevedo, 2006). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs plus sélectifs serait envisageable afin de pouvoir tirer davantage d'informations à ce niveau puisqu'en raison des résultats obtenus, rien ne peut être conclu au sujet de l'implication de cette voie dans l'inhibition de l'IL-12 induite par l'HZ.

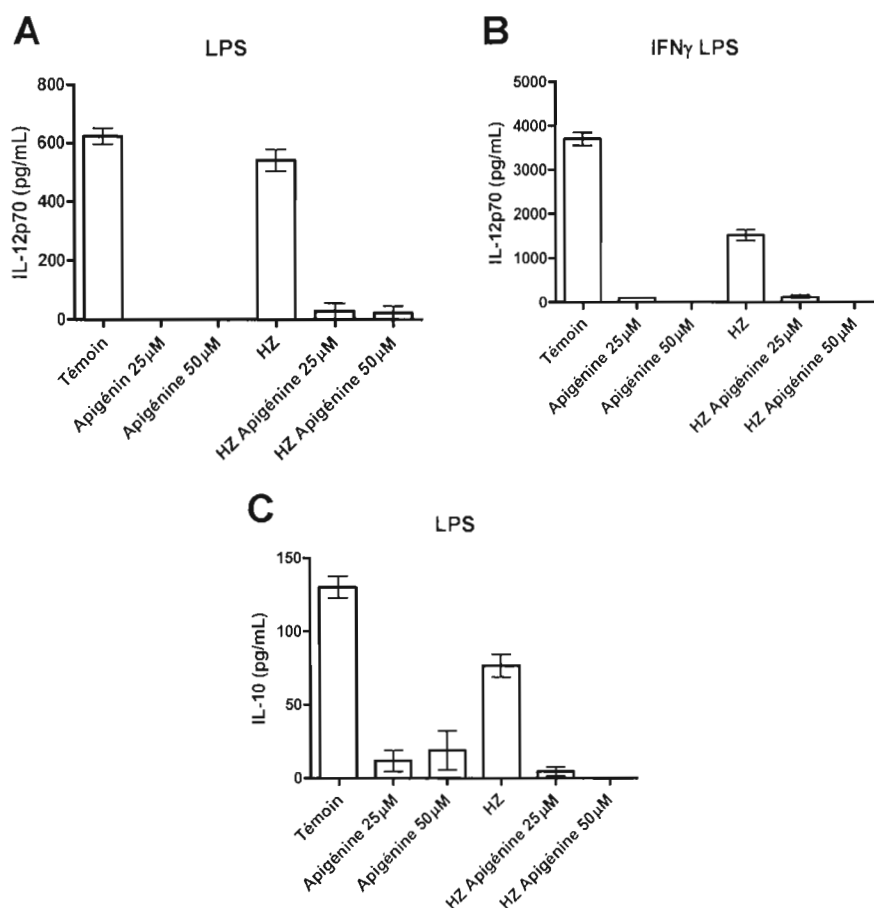


Figure 4.7 : Effet d'un inhibiteur de la MAPK ERK (Apigénine) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 par des BMMps murins. Des BMMps (5×10^4 cellules/puits) ont été prétraités ou non avec de l'HZ (25μg/mL) pendant 24 heures. Une heure avant la stimulation par LPS (50ng/mL) ou LPS et IFN γ (50U/mL), de l'Apigénine (25-50μM) a été ajouté au milieu de culture. Les surnageants ont été récupérés puis dosés pour leur contenu en IL-12p70 (Fig. 4.7 A et 4.7C) et IL-10 (Fig. 4.7B) par ELISA. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

4.2.4 Effet d'un inhibiteur de la voie de la p38 MAPK sur la production de cytokines par les BMMps (prétraités ou non avec de l'HZ ou du DEM) suite à une stimulation par LPS ou par IFN γ /LPS.

La voie de la p38 MAP kinase est impliquée tant au niveau de la production d'IL-12 (Utsugi et al., 2003) qu'à celle de l'IL-10 (Chanteux et al., 2007; Salmon et al., 2001). De plus, la sécrétion d'IL-12 induite par LPS par l'intermédiaire la voie de la p38 MAPK est sous régulation rédox (Utsugi et al., 2002). Puisque le DEM affecte le statut redox et la production d'IL-12p70 des Mps et que l'hème induit l'expression de la HO-1 (Schwarzer et al., 1999) par la voie de la MAPK p38 (Kocanova et al., 2007), et étant donné que l'HZ est un polymère d'hème, il nous semblait nécessaire d'évaluer le comportement des BMMps prétraités avec de l'HZ ou du DEM lorsque mis en présence d'un inhibiteur sélectif de cette voie.

Après avoir analysé le comportement des BMMps prétraités par HZ et HE (2 CRFs), nous tenions à comparer le comportement des BMMps prétraités avec de l'HZ à celui des BMMps prétraités avec un agent oxydant classique mais dépourvu de fer, le DEM. À cette fin, un inhibiteur sélectif de la p38 MAPK (SB203580) a été utilisé à deux concentrations différentes (0,1 et 1 μ M) sur une culture de BMMps prétraités ou non avec de l'HZ (25 μ g/mL, 24h) ou du DEM (25 μ M, 4h). Étonnamment, tel que mentionné au chapitre 3 de ce travail, suite à une stimulation par LPS, les deux concentrations de SB203580 ont mené à une augmentation de l'IL-12p70 (devenant significative à 1 μ M) et ce, chez les différentes conditions de Mps (témoins, HZ et DEM) (Figure 4.8A). L'on voit également que l'augmentation d'IL-12p70 semble associée à une diminution de la sécrétion d'IL-10 (Figure 4.8B). Ces résultats nous ont tout d'abord surpris puisqu'il a été suggéré que le SB203580 avait un effet inhibiteur direct sur la production d'IL-12p70. Or, il a été rapporté que cet effet pouvait être affecté en présence de conditions robustes de production d'IL-10 puisque la production de cette cytokine (sous le contrôle de la p38 MAPK) pourrait interférer avec la sécrétion d'IL-12p70. Donc nos résultats semblent au contraire indiquer que l'inhibition de la p38 MAPK restaure la production d'IL-12p70 et ce, même dans des conditions pauvres en IL-10. Cependant, lorsqu'une pré-stimulation par l'IFN γ est effectuée avant l'ajout du LPS, les tendances restent les mêmes, sans toutefois être significatives, mais l'on voit que chez les cellules traitées pendant 24 heures par HZ ou pendant 4 heures par DEM, la production d'IL-12p70 est toujours inférieure à celle des Mps témoins (Figure 4.8C et 4.8D) tant au niveau de la production d'IL-12p70 que de celle d'IL-10 (inhibition significative chez les

BMMps prétraités par DEM en présence d'une concentration de SB203580 de 1 μ M (Figure 4.8D)).

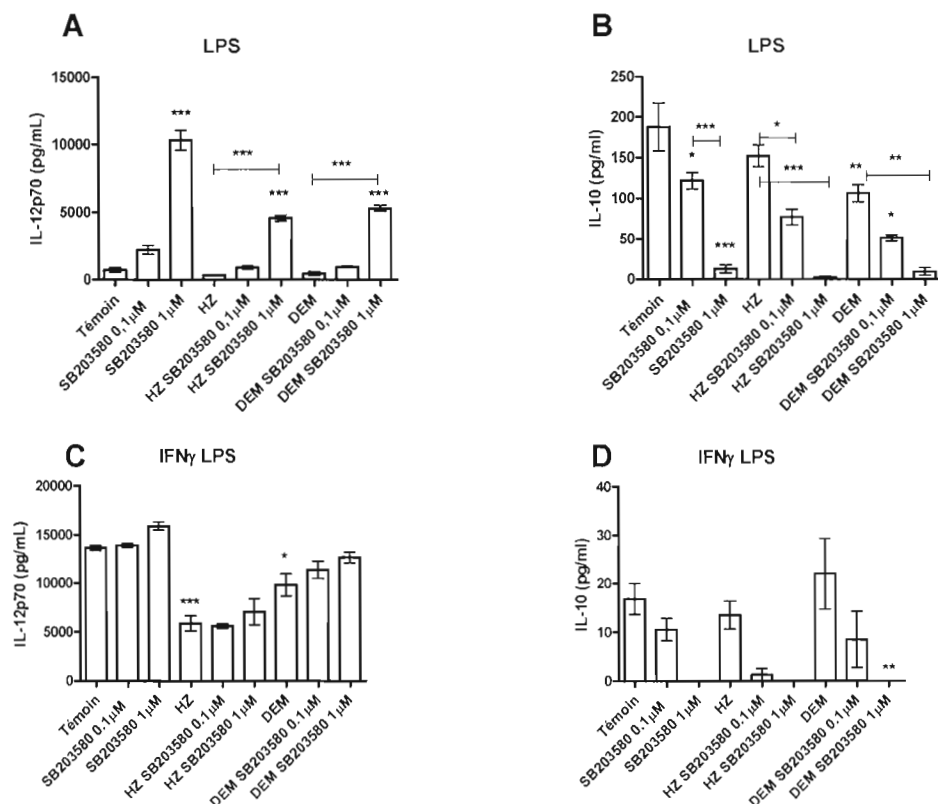


Figure 4.8 : Effet d'un inhibiteur de la p38 MAPK (SB203580) sur la production d'IL-12p70 et d'IL-10 chez des BMMps murins prétraités ou non par de l'HZ ou du DEM. Des BMMps (5×10^4 cellules/puits) ont été prétraités avec de l'HZ (25 μ g/mL) pendant 24 heures ou avec du DEM (25 μ M) pendant 4 heures. Une heure avant la stimulation par LPS (50ng/mL) ou IFN γ (50U/mL) et LPS, du SB203580 (0,1 ou 1 μ M) a été ajouté au milieu de culture. Les surnageants ont été récupérés puis dosés pour leur contenu en IL-12p70 (Fig. 4.8A et 4.8C) et IL-10 (Fig. 4.8B et 4.8D) par ELISA. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et représentent la valeur moyenne \pm SEM de triplicata.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Les Mps jouent un rôle déterminant dans le développement de la réponse immunitaire de l'hôte envers l'infection (Feng et al., 1999). Durant les infections par *Plasmodium*, les GRp ainsi que l'HZ libre sont avidement phagocytés par les monocytes en circulation, les neutrophiles ainsi que par les Mps résidents (Jaramillo et al., 2005; Schwarzer et al., 2003; Schwarzer et al., 1996). L'accumulation d'HZ au sein des phagocytes a été associée à l'inhibition de leurs fonctions cellulaires accessoires normales (Scorza et al., 1999). Or, le mécanisme par lequel cette suppression est effectuée n'a pas encore été bien élucidé (Morakote et Justus, 1988; Scorza et al., 1999). De plus, l'accumulation d'HZ au sein des CPAs, à la fois au cours d'études *in vivo* et *in vitro*, a été associée à une inhibition de la production d'IL-12 : une inhibition des transcripts d'ARNm d'IL-12p40 ainsi qu'une inhibition de l'IL-12p70 en circulation (Keller et al., 2006) tout comme il en est le cas pour les infections par *Plasmodium* (Xu et al., 2001).

Feng et al. (1999) ont proposé que le lipophosphoglycan de *Leishmania* pourrait induire la survie du parasite en inhibant la production d'IL-12 par les Mps par stimulation de la MAPK ERK. Dans la même direction, au sein de notre modèle d'étude, l'HZ inhibe également la production d'IL-12 par les Mps, ce qui pourrait favoriser la survie du parasite. En effet, suite à un traitement avec de l'IL-12 recombinant, les souris déficientes en IL-12 parvenaient à résoudre l'infection (Hoffman et al., 1997; Sedegah et al., 1994). De plus, puisqu'il a été suggéré que l'HZ induisait la phosphorylation de ERK ainsi que l'activation du facteur transcriptionnel NFκB et la génération d'EROs (Jaramillo et al., 2005), il serait envisageable que l'activation de ERK soit en partie responsable de cette inhibition et ce, par une baisse de la transcription de l'IL-12 suite à la stimulation par LPS (Feng et al., 1999).

Or, d'après nos résultats, cette inhibition semble davantage agir au niveau de la voie de JNK puisque l'ajout d'un inhibiteur de la voie de ERK affecte de façon comparable la production d'IL-12 chez les cellules témoins et traitées avec de l'HZ et que dans notre modèle d'étude, les EROs ne sont pas induits d'avantage par l'HZ. Il est cependant important de signaler que rien n'a pu être

conclu par cette étude en ce qui a trait à l'implication de cette voie dans l'inhibition de l'IL-12 par l'HZ puisque l'inhibiteur utilisé bloquait toute réponse. En contraste, l'inhibiteur de la MAPK JNK (SP600125) augmente de façon plus prononcée les niveaux d'IL-12p70 en réponse à l'IFN γ et au LPS chez les BMMps prétraités avec de l'HZ. De plus, par l'ajout de SP600125 aux cellules prétraitées avec de l'HZ, leur production d'IL-12 devient comparable à celle des cellules témoins (en absence d'inhibiteur). Ainsi, cet inhibiteur semble bloquer, du moins partiellement, l'effet suppresseur de l'HZ sur la production d'IL-12p70 induite par de l'IFN γ et du LPS.

Une étude effectuée chez des monocytes humains a démontré l'effet régulateur positif du SP600125 au niveau de la production d'IL-12p70 et d'IL-12p40 en réponse au LPS par des Mps humains (Utsugi et al., 2003) ; le LPS étant par lui seul un inducteur d'EROs (Hsu et Wen, 2002). En contraste, dans notre étude, le traitement par SP600125 n'a engendré aucune différence significative dans la production d'IL-12p70 induite par LPS chez les BMMps témoins ou traités avec de l'HZ en comparaison au niveau obtenu en absence d'inhibiteur (en absence d'IFN γ).

L'effet de l'HZ sur la voie de JNK dans des conditions de stimulation avec de l'IFN γ est important à considérer étant donné que cette cytokine est un activateur important des Mps durant les infections par *Plasmodium* (Denkers et Gazzinelli, 2007). Ainsi, il semblait important de le considérer au niveau de la production de l'IL-12p70 biologiquement active.

Les BMMps prétraités avec de l'HZ semblent plus sensibles au CAPE et ce pour les différentes concentrations testées. Cette sensibilité accrue pourrait être expliquée par le fait qu'un traitement de 24 heures avec de l'HZ augmente le ratio intracellulaire de GSH/GSSG et que l'activation de NF κ B est inhibée (ou du moins diminuée) dans des conditions trop réductrices (Haddad et Harb, 2005). Ainsi, l'activation de NF κ B étant déjà diminuée, l'ajout de l'inhibiteur pourrait avoir un effet plus prononcé.

Un rôle important est attribué au statut redox des cellules au sein du développement d'une réponse immunitaire adaptatrice. Le statut redox des CPAs est d'autant plus important puisque ces dernières assurent le premier contact avec le pathogène. Ainsi, les oxydants contrôlent le développement des réponses immunitaires en modifiant le statut redox des cellules hôtes (Obata et al., 2006). En effet, alors que les cellules possédant un ratio intracellulaire GSH/GSSG élevé produisent en avantage des cytokines T_H1 (ou d'IL-12) (Lehmann et al., 2007), les cellules oxydées ont une réponse T_H1 affaiblie ou sécrètent plus de cytokines T_H2 (Obata et al., 2006) ;

ainsi, les CPAs plus « réduites » produisent plus d'IL-12 alors que les cellules « oxydées » en produisent moins. Dans la même direction, des études impliquant des inhibiteurs des MAPK p38 et JNK ont démontré que ces voies sont sous le contrôle redox du GSH (Utsugi et al., 2003). Ainsi, alors que le NAC et le GSH-OEt augmentent tous deux le ratio intracellulaire GSH/GSSG et la phosphorylation de la p38 induite par LPS, ils inhibent celle de JNK (Utsugi et al., 2003). Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, l'inhibition de la production d'IL-12p70 induite par IFN γ et LPS suite à un traitement par le DEM. En effet, cet agent oxydant diminue le ratio intracellulaire GSH/GSSG et l'ajout de NAC restaure de façon significative la production de l'IL-12p70 suite à un tel traitement. De plus, puisque JNK régule négativement la production d'IL-12 induite par LPS et qu'une augmentation du ratio GSH/GSSG inhibe l'activation de JNK, la diminution du ratio GSH/GSSG induit par DEM serait possiblement responsable de l'inhibition d'IL-12 associée à une augmentation de l'activation de JNK. Il nous reste cependant à évaluer l'activation de cette voie par des méthodes plus directes, mesurant la phosphorylation de kinases impliquées dans cette voie, plus spécifiquement les JNK/SAPK (protéine kinase activée par le stress) p46 et p54 qui sont doublement phosphorylées (lorsque activées) sur le résidu thréonine 183 (Thr183) et sur le résidu Tyrosine 185 (Tyr185).

Étant donné que l'HZ augmente le ratio intracellulaire GSH/GSSG par rapport au témoin cellulaire, une inhibition de la voie de JNK aurait été attendue, avec une augmentation concomitante de la production d'IL-12, ce qui est contraire aux résultats obtenus. Il est néanmoins probable que l'activation « possible » de JNK par l'HZ puisse se produire par un mécanisme indépendant des EROs. Dans la même direction, Jaramillo et collaborateurs (2005) ont observé qu'en plus d'induire des signaux dépendants des EROs, l'HZ en induit également des indépendants de celles-ci. Dans notre modèle d'étude, aucune production d'EROs n'a été détectée suite au traitement des BMMps par l'HZ. Néanmoins, nous avons étudié la production d'EROs chez les cellules stimulées par l'HZ durant 1h et il reste à déterminer si un traitement de 24 heures induit d'avantage d'EROs en présence de LPS, ce qui pourrait activer JNK, une voie sensible aux conditions de stress (Kaneto et al., 2004; Kaneto et al., 2007).

Jaramillo et al. (2005) ont démontré que l'HZ induit un faible stress oxydatif après une courte période de traitement, qui pourrait effectivement s'accroître après 24 heures de traitement (ou avoir une répercussion sur les EROs suite à la stimulation par LPS); ce léger stress oxydatif semblerait être en partie responsable de l'activation de NF κ B et serait requis pour l'induction d'ARNm de chimiokines induites par HZ (Jaramillo et al., 2005).

Or, l'effet de l'HZ semble dépendre principalement de la susceptibilité de la cellule au stress oxydatif, qui peut varier en fonction du type cellulaire et donc du niveau de défenses anti-oxydantes (Jaramillo et al., 2005), ce qui pourrait expliquer les différences observées avec des modèles d'étude distincts. De plus, tel que mentionné précédemment, la taille des cristaux d'HZ a également été attribuée à ses effets pro-oxydants (Oliveira et al., 2002) ; ainsi, les différents types d'HZ utilisés au sein des divers laboratoires peut expliquer les différences de résultats obtenus.

En conclusion, cette étude nous a permis de caractériser un peu plus, chez les BMMps, les changements fonctionnels induits par l'HZ qui contrôlent la production d'IL-12p70. Nous avons remarqué qu'un inhibiteur de la voie de JNK restaure partiellement l'inhibition de l'IL-12p70 par l'HZ et que les cellules prétraitées avec de l'HZ semblent plus sensibles à l'inhibiteur de la voie de NFκB. D'après les effets associés au DEM sur les niveaux intracellulaires de GSH/GSSG et les résultats rapportés par Chan et al. (1999) par rapport à l'inhibition de la voie de JNK par le GSH-OEt, nous suggérons que l'inhibition d'IL-12p70 par le DEM pourrait être soutenue en partie par l'augmentation de l'activation de JNK.

OUVERTURE SUR LE PROJET

En ayant comparé la réponse des BMMps témoins versus HZ ou HE aux inhibiteurs afin d'établir si des comportements comparables étaient observés, quelques voies d'intérêts ont été ciblées afin d'approfondir l'étude en mesurant les niveaux de phosphorylation de certaines kinases au sein de notre modèle d'étude. En effet, la principale voie d'intérêt jusqu'à présent est celle de la MAPK JNK en raison des observations tirées de cette étude.

De plus, malgré le fait que l'HE de SIGMA est un oxydant, elle ne semble pas répondre au NAC et n'induit pas d'IL-10 par rapport au témoin cellulaire. Par contre, alors que l'HE de Fluka (purifiée par HPLC et insoluble dans du RPMI) semble avoir un effet inhibiteur comparable à celui de son homologue de SIGMA sur l'IL-12p70 en réponse à l'IFN γ et au LPS, cet effet est corrigé par le NAC. Cette HE est en plus inductrice de l'IL-10 et l'ajout d'un anticorps neutralisant anti-IL-10 de même que l'ajout du SB203580 (inhibiteur sélectif de la p38 MAPK) corrige l'inhibition de l'IL-12p70. Ainsi, ces expériences devront être répétées avec l'HE Fluka et des témoins adaptés, c'est-à-dire des BMMps traités avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 1mM, puisque cette HE est soluble dans cette solution (une concentration finale de 0.01 mM NaOH en considérant une dilution 1/100 du stock d'HE). Dans la même direction, des expériences additionnelles seront nécessaires pour comparer l'HE de FLUKA avec l'HZ et ce, à des concentrations différentes.

Finalement, nous envisageons d'utiliser des BMMps de souris IL-10^{-/-} afin de confirmer le caractère IL-10-indépendant de l'effet inhibiteur de l'HZ.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdi K (2002) IL-12: the role of p40 versus p75. *Scandinavian journal of immunology* **56**:1-11.
- Agrawal A, Dillon S, Denning TL, Pulendran B (2006) ERK1/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **176**:5788-5796.
- Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. (2003) Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* **171**:4984-4989.
- Alam J, Camhi S, Choi AM (1995) Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *The Journal of biological chemistry* **270**:11977-11984.
- Allen PM, Unanue ER (1984) Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. *J Immunol* **132**:1077-1079.
- Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G (1998) Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* **160**:5936-5944.
- Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, Weisbrodt NW, et al. (2004) Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research* **118**:53-57.
- Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M (2004) Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* **1**:20.
- Bach FH (2006) Carbon monoxide: from the origin of life to molecular medicine. *Trends in molecular medicine* **12**:348-350.
- Barouki R (2006) [Ageing free radicals and cellular stress]. *Med Sci (Paris)* **22**:266-272.
- Basilico N, Tognazioli C, Picot S, Ravagnani F, Taramelli D (2003) Synergistic and antagonistic interactions between haemozoin and bacterial endotoxin on human and mouse macrophages. *Parassitologia* **45**:135-140.
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International journal for parasitology* **34**:163-189.
- Beckman KB, Ames BN (1999) Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutation research* **424**:51-58.
- Biswas S, Karmarkar MG, Sharma YD (2001) Antibodies detected against Plasmodium falciparum haemozoin with inhibitory properties to cytokine production. *FEMS microbiology letters* **194**:175-179.
- Bondeson J, Browne KA, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M (1999) Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent. *J Immunol* **162**:2939-2945.
- Boutlis CS, Lagog M, Chaisavaneeyakorn S, Misukonis MA, Bockarie MJ, Mgone CS, et al. (2003) Plasma interleukin-12 in malaria-tolerant papua new guineans: inverse

correlation with *Plasmodium falciparum* parasitemia and peripheral blood mononuclear cell nitric oxide synthase activity. *Infection and immunity* **71**:6354-6357.

Brennan P, O'Neill LA (1996) 2-mercaptoethanol restores the ability of nuclear factor kappa B (NF kappa B) to bind DNA in nuclear extracts from interleukin 1-treated cells incubated with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Evidence for oxidation of glutathione in the mechanism of inhibition of NF kappa B by PDTC. *The Biochemical journal* **320** (Pt 3):975-981.

Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, Williams S, Lowe B, Nyanoti M, et al. (2006) Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* **108**:2569-2577.

Chaisavaneeyakorn S, Othoro C, Shi YP, Otieno J, Chaiyaroj SC, Lal AA, et al. (2003) Relationship between plasma Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in western Kenya. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **10**:362-366.

Chaiyaroj SC, Rutta AS, Muenthaisong K, Watkins P, Na Ubol M, Looareesuwan S (2004) Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta tropica* **89**:319-327.

Chanteux H, Guisset AC, Pilette C, Sibille Y (2007) LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKs- and Spl-dependent mechanisms. *Respiratory research* **8**:71.

Chauveau C, Remy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, et al. (2005) Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**:1694-1702.

Clerget M, Polla BS (1990) Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:1081-1085.

Collins DS, Unanue ER, Harding CV (1991) Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. *J Immunol* **147**:4054-4059.

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, et al. (1992) Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of experimental medicine* **176**:1387-1398.

Davies KJ (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* **50**:279-289.

Deans JA, Cohen S (1983) Immunology of malaria. *Annual review of microbiology* **37**:25-49.

Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Dumon MF, Receveur MC, Le Bras M, Clerc M (1995) Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clinical biochemistry* **28**:163-169.

Denkers EY, Gazzinelli RT (2007) *Protozoans in Macrophages* 1st edition ed. Landes Biosciences: Austin, Texas, 223 pp.

Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, et al. (2004) A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* **172**:4733-4743.

- Dobashi K, Aihara M, Araki T, Shimizu Y, Utsugi M, Iizuka K, et al. (2001) Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clinical and experimental immunology* **124**:290-296.
- Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, et al. (1994) Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *Faseb J* **8**:1131-1138.
- Ekvall H (2003) Malaria and anemia. *Current opinion in hematology* **10**:108-114.
- Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL (1998) Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **273**:8922-8931.
- Erel O, Kocyigit A, Avci S, Aktepe N, Bulut V (1997) Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clinical biochemistry* **30**:631-639.
- Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, et al. (1999) Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol* **163**:6403-6412.
- Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. (2007) Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* **282**:20221-20229.
- Finkel T (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology* **15**:247-254.
- Fiori PL, Rappelli P, Mirkarimi SN, Ginsburg H, Cappuccinelli P, Turrini F (1993) Reduced microbicidal and anti-tumour activities of human monocytes after ingestion of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Parasite immunology* **15**:647-655.
- Francis SE, Sullivan DJ, Jr., Goldberg DE (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Annual review of microbiology* **51**:97-123.
- Gamain B, Arnaud J, Favier A, Camus D, Dive D, Slomianny C (1996) Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation. *Free radical biology & medicine* **21**:559-565.
- Gmunder H, Eck HP, Benninghoff B, Roth S, Droge W (1990) Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. *Cellular immunology* **129**:32-46.
- Goriely S, Molle C, Nguyen M, Albarani V, Haddou NO, Lin R, et al. (2006) Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood* **107**:1078-1084.
- Griffiths MJ, Ndungu F, Baird KL, Muller DP, Marsh K, Newton CR (2001) Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria. *British journal of haematology* **113**:486-491.
- Haddad JJ (2002) The involvement of L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione/GSH) in the mechanism of redox signaling mediating MAPK(p38)-dependent regulation of pro-inflammatory cytokine production. *Biochemical pharmacology* **63**:305-320.

- Haddad JJ, Harb HL (2005) L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Molecular immunology* **42**:987-1014.
- Halliwell B, Gutteridge J (1988) *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press: Oxford.
- Hansen JM, Go YM, Jones DP (2006) Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* **46**:215-234.
- Hayes JD, McLellan LI (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research* **31**:273-300.
- Heinzel FP, Hujer AM, Ahmed FN, Rerko RM (1997) In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J Immunol* **158**:4381-4388.
- Hoffman SL, Crutcher JM, Puri SK, Ansari AA, Villinger F, Franke ED, et al. (1997) Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12. *Nature medicine* **3**:80-83.
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, NY)* **260**:547-549.
- Hsu HY, Wen MH (2002) Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *The Journal of biological chemistry* **277**:22131-22139.
- Iles KE, Dickinson DA, Wigley AF, Welty NE, Blank V, Forman HJ (2005) HNE increases HO-1 through activation of the ERK pathway in pulmonary epithelial cells. *Free radical biology & medicine* **39**:355-364.
- Immenschuh S, Hinke V, Katz N, Kietzmann T (2000) Transcriptional induction of heme oxygenase-1 gene expression by okadaic acid in primary rat hepatocyte cultures. *Molecular pharmacology* **57**:610-618.
- Immenschuh S, Kietzmann T, Hinke V, Wiederhold M, Katz N, Muller-Eberhard U (1998) The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures. *Molecular pharmacology* **53**:483-491.
- Jaramillo M, Godbout M, Olivier M (2005) Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* **174**:475-484.
- Jaramillo M, Gowda DC, Radzioch D, Olivier M (2003) Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways. *J Immunol* **171**:4243-4253.
- Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* **100**:879-887.
- Kaneto H, Kawamori D, Nakatani Y, Gorogawa S, Matsuoka TA (2004) Oxidative stress and the JNK pathway as a potential therapeutic target for diabetes. *Drug news & perspectives* **17**:447-453.

- Kaneto H, Matsuoka TA, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Yoshiuchi K, et al. (2007) Oxidative stress and the JNK pathway are involved in the development of type 1 and type 2 diabetes. *Current molecular medicine* 7:674-686.
- Kang BY, Kim E, Kim TS (2005) Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. *Cellular signalling* 17:665-673.
- Kaur P, Kalia S, Bansal MP (2006) Effect of diethyl maleate induced oxidative stress on male reproductive activity in mice: redox active enzymes and transcription factors expression. *Molecular and cellular biochemistry* 291:55-61.
- Keller CC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ (2004) Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infection and immunity* 72:4868-4873.
- Keller CC, Yamo O, Ouma C, Ong'echa JM, Ounah D, Hittner JB, et al. (2006) Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infection and immunity* 74:5249-5260.
- Kim JM, Kim H, Kwon SB, Lee SY, Chung SC, Jeong DW, et al. (2004) Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. *Biochemical and biophysical research communications* 325:101-108.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Kuby J, Osborne BA (2006) *Kuby Immunology* Sixth edition ed. W. H. Freeman: New York, 574 pp.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 170:827-845.
- Kocanova S, Buytaert E, Matroule JY, Piette J, Golab J, de Witte P, et al. (2007) Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38MAPK and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. *Apoptosis* 12:731-741.
- Komatsu H, Hoshino A, Funayama M, Kawahara K, Obata F (2003) Oxidative modulation of the glutathione-redox couple enhances lipopolysaccharide-induced interleukin 12 P40 production by a mouse macrophage cell line, J774A.1. *Free radical research* 37:293-299.
- Kroening PR, Barnes TW, Pease L, Limper A, Kita H, Vassallo R (2008) Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J Immunol* 181:1536-1547.
- Kumar S, Bandyopadhyay U (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157:175-188.
- Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J (2006) Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 8:1-22.
- Lang D, Reuter S, Buzescu T, August C, Heidenreich S (2005) Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. *International immunology* 17:155-165.

- Lee TS, Chau LY (2002) Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature medicine* **8**:240-246.
- Lehmann JC, Listopad JJ, Rentzsch CU, Igney FH, von Bonin A, Hennekes HH, et al. (2007) Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *The Journal of investigative dermatology* **127**:835-845.
- Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, et al. (1995) Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* **154**:116-127.
- Liu J, Cao S, Herman LM, Ma X (2003) Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *The Journal of experimental medicine* **198**:1265-1276.
- Liu J, Guan X, Tamura T, Ozato K, Ma X (2004) Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **279**:55609-55617.
- Lo WC, Lu PJ, Ho WY, Hsiao M, Tseng CJ (2006) Induction of heme oxygenase-1 is involved in carbon monoxide-mediated central cardiovascular regulation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **318**:8-16.
- Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE (2002) IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol* **3**:7.
- Lu HT, Yang DD, Wysk M, Gatti E, Mellman I, Davis RJ, et al. (1999) Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *The EMBO journal* **18**:1845-1857.
- Luersen K, Walter RD, Muller S (2000) Plasmodium falciparum-infected red blood cells depend on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *The Biochemical journal* **346 Pt 2**:545-552.
- Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, et al. (2000) Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria. *Infection and immunity* **68**:3909-3915.
- Mallon R, Feldberg L, Kim S, Collins K, Wojciechowicz D, Kohler C, et al. (2004) Identification of 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile inhibitors of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1 kinase. *Molecular cancer therapeutics* **3**:755-762.
- Marriott JB, Clarke IA, Dalglish AG (2001) Inhibition of p38 MAP kinase during cellular activation results in IFN-gamma-dependent augmentation of IL-12 production by human monocytes/macrophages. *Clinical and experimental immunology* **125**:64-70.
- Mathews ST, Selvam R (1991) Effect of radical treatment on erythrocyte lipid peroxidation in Plasmodium vivax-infected malaria patients. *Biochemistry international* **25**:211-220.
- Mazzeo D, Sacco S, Di Lucia P, Penna G, Adorini L, Panina-Bordignon P, et al. (2002) Thiol antioxidants inhibit the formation of the interleukin-12 heterodimer: a novel mechanism for the inhibition of IL-12 production. *Cytokine* **17**:285-293.
- Moore JM, Chaisavaneeyakorn S, Perkins DJ, Othoro C, Otieno J, Nahlen BL, et al. (2004) Hemozoin differentially regulates proinflammatory cytokine production in human

- immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women with placental malaria. *Infection and immunity* **72**:7022-7029.
- Moorthy VS, Good MF, Hill AV (2004) Malaria vaccine developments. *Lancet* **363**:150-156.
- Morakote N, Justus DE (1988) Immunosuppression in malaria: effect of hemozoin produced by *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. *International archives of allergy and applied immunology* **86**:28-34.
- Morel Y, Barouki R (1998) Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Médecine Science* **14**:713-721.
- Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M (1968) Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood* **32**:811-815.
- Murata Y, Amao M, Yoneda J, Hamuro J (2001) Intracellular thiol redox status of macrophages directs the Th1 skewing in thioredoxin transgenic mice during aging. *Molecular immunology* **38**:747-757.
- Murata Y, Ohteki T, Koyasu S, Hamuro J (2002a) IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. *European journal of immunology* **32**:2866-2873.
- Murata Y, Shimamura T, Hamuro J (2002b) The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *International immunology* **14**:201-212.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* **15**:351-369.
- Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, et al. (2006) Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:15136-15141.
- Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, et al. (2003) The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol* **170**:3337-3347.
- Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A (2004) Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* **20**:126-133.
- Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine* **31**:1287-1312.
- Obata F, Hoshino A, Toyama A (2006) Hydrogen peroxide increases interleukin-12 p40/p70 molecular ratio and induces Th2-predominant responses in mice. *Scandinavian journal of immunology* **63**:125-130.
- Oliveira MF, Timm BL, Machado EA, Miranda K, Attias M, Silva JR, et al. (2002) On the pro-oxidant effects of haemozoin. *FEBS Lett* **512**:139-144.
- Omodeo-Sale F, Monti D, Olliaro P, Taramelli D (2001) Prooxidant activity of beta-hematin (synthetic malaria pigment) in arachidonic acid micelles and phospholipid large unilamellar vesicles. *Biochemical pharmacology* **61**:999-1009.

- Omodeo-Sale F, Motti A, Basilico N, Parapini S, Olliaro P, Taramelli D (2003) Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood* **102**:705-711.
- Ong'echa JM, Remo AM, Kristoff J, Hittner JB, Were T, Ouma C, et al. (2008) Increased circulating interleukin (IL)-23 in children with malarial anemia: in vivo and in vitro relationship with co-regulatory cytokines IL-12 and IL-10. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **126**:211-221.
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine* **6**:422-428.
- Otterbein LE, Choi AM (2000) Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American journal of physiology* **279**:L1029-1037.
- Pabon A, Carmona J, Burgos LC, Blair S (2003) Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clinical biochemistry* **36**:71-78.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and applied pharmacology* **202**:199-211.
- Parham P (2003) *Le système immunitaire*. De Boeck: Paris, 407 pp.
- Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG (2000) Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis* **182**:988-992.
- Perry JA, Olver CS, Burnett RC, Avery AC (2005) Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J Immunol* **174**:5921-5925.
- Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C (1998) Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:3071-3076.
- Pichyangkul S, Saengkrai P, Webster HK (1994) *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **51**:430-435.
- Porto BN, Alves LS, Fernandez PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graca-Souza AV, et al. (2007) Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *The Journal of biological chemistry* **282**:24430-24436.
- Postma NS, Mommers EC, Eling WM, Zuidema J (1996) Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharm World Sci* **18**:121-129.
- Presky DH, Minetti LJ, Gillessen S, Wilkinson VL, Wu CY, Gubler U, et al. (1998) Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. *J Immunol* **160**:2174-2179.
- Rahim SS, Khan N, Boddupalli CS, Hasnain SE, Mukhopadhyay S (2005) Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in RAW 264.7 cells also involves c-rel transcription factor. *Immunology* **114**:313-321.
- Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L (2006) Regulating immunity to malaria. *Parasite immunology* **28**:35-49.
- Rincon M, Flavell RA, Davis RJ (2001) Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* **20**:2490-2497.

- Salmon RA, Guo X, Teh HS, Schrader JW (2001) The p38 mitogen-activated protein kinases can have opposing roles in the antigen-dependent or endotoxin-stimulated production of IL-12 and IFN-gamma. *European journal of immunology* **31**:3218-3227.
- Satoskar AR, Stamm LM, Zhang X, Satoskar AA, Okano M, Terhorst C, et al. (1999) Mice lacking NK cells develop an efficient Th1 response and control cutaneous Leishmania major infection. *J Immunol* **162**:6747-6754.
- Schreck R, Grassmann R, Fleckenstein B, Baeuerle PA (1992) Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *J Virol* **66**:6288-6293.
- Schwarzer E, De Matteis F, Giribaldi G, Ulliers D, Valente E, Arese P (1999) Hemozoin stability and dormant induction of heme oxygenase in hemozoin-fed human monocytes. *Molecular and biochemical parasitology* **100**:61-72.
- Schwarzer E, Kuhn H, Valente E, Arese P (2003) Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood* **101**:722-728.
- Schwarzer E, Muller O, Arese P, Siems WG, Grune T (1996) Increased levels of 4-hydroxynonenal in human monocytes fed with malarial pigment hemozoin. A possible clue for hemozoin toxicity. *FEBS Lett* **388**:119-122.
- Schwarzer E, Skorokhod OA, Barrera V, Arese P (2008) Hemozoin and the human monocyte--a brief review of their interactions. *Parassitologia* **50**:143-145.
- Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P (1992) Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *The Journal of experimental medicine* **176**:1033-1041.
- Scorza T, Magez S, Brys L, De Baetselier P (1999) Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite immunology* **21**:545-554.
- Sedegah M, Finkelman F, Hoffman SL (1994) Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:10700-10702.
- Sherry BA, Alava G, Tracey KJ, Martiney J, Cerami A, Slater AF (1995) Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. *Journal of inflammation* **45**:85-96.
- Short S, Merkel BJ, Caffrey R, McCoy KL (1996) Defective antigen processing correlates with a low level of intracellular glutathione. *European journal of immunology* **26**:3015-3020.
- Skorokhod OA, Alessio M, Mordmuller B, Arese P, Schwarzer E (2004) Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol* **173**:4066-4074.
- Soares R, Azevedo I (2006) Apigenin: is it a pro- or anti-inflammatory agent? *The American journal of pathology* **168**:1762; author reply 1762-1763.
- Sponaas AM, Cadman ET, Voisine C, Harrison V, Boonstra A, O'Garra A, et al. (2006) Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. *The Journal of experimental medicine* **203**:1427-1433.

- Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG, et al. (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:6808-6812.
- Stevenson MM, Su Z, Sam H, Mohan K (2001) Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**:49-59.
- Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A (1995) IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* **155**:2545-2556.
- Su Z, Stevenson MM (2000) Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infection and immunity* **68**:4399-4406.
- Su Z, Stevenson MM (2002) IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol* **168**:1348-1355.
- Suh KN, Kain KC, Keystone JS (2004) Malaria. *Cmaj* **170**:1693-1702.
- Sullivan DJ, Jr., Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE (1996) On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:11865-11870.
- Taramelli D, Recalcati S, Basilico N, Olliaro P, Cairo G (2000) Macrophage preconditioning with synthetic malaria pigment reduces cytokine production via heme iron-dependent oxidative stress. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **80**:1781-1788.
- Taylor-Robinson AW (1995) Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today* **11**:334-342.
- Thumwood CM, Hunt NH, Cowden WB, Clark IA (1989) Antioxidants can prevent cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected mice. *British journal of experimental pathology* **70**:293-303.
- Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Zhang JG, Fariss MW (2000) Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chemico-biological interactions* **127**:201-217.
- Turrens JF (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular aspects of medicine* **25**:211-220.
- Turrini F, Ginsburg H, Bussolino F, Pescarmona GP, Serra MV, Arese P (1992) Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood* **80**:801-808.
- Tyrrell R (1999) Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1. *Free radical research* **31**:335-340.
- Udono-Fujimori R, Takahashi K, Takeda K, Furuyama K, Kaneko K, Takahashi S, et al. (2004) Expression of heme oxygenase-1 is repressed by interferon-gamma and induced by hypoxia in human retinal pigment epithelial cells. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**:3076-3084.

- Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Endou K, Hamuro J, Murata Y, et al. (2003) c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* **171**:628-635.
- Utsugi M, Dobashi K, Koga Y, Shimizu Y, Ishizuka T, Iizuka K, et al. (2002) Glutathione redox regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production through p38 mitogen-activated protein kinase activation in human monocytes: role of glutathione redox in IFN-gamma priming of IL-12 production. *Journal of leukocyte biology* **71**:339-347.
- Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, et al. (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* **55**:551-571.
- Wiesel P, Foster LC, Pellacani A, Layne MD, Hsieh CM, Huggins GS, et al. (2000) Thioredoxin facilitates the induction of heme oxygenase-1 in response to inflammatory mediators. *The Journal of biological chemistry* **275**:24840-24846.
- Wijayanti N, Huber S, Samoylenko A, Kietzmann T, Immenschuh S (2004) Role of NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways in the lipopolysaccharide-dependent activation of heme oxygenase-1 gene expression. *Antioxidants & redox signaling* **6**:802-810.
- Woo J, Iyer S, Cornejo MC, Mori N, Gao L, Sipos I, et al. (1998) Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). *Transpl Immunol* **6**:84-93.
- Wroczynska A, Nahorski W, Bakowska A, Pietkiewicz H (2005) Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. *International maritime health* **56**:103-114.
- Wykes M, Good MF (2007) A case for whole-parasite malaria vaccines. *International journal for parasitology* **37**:705-712.
- Xu X, Sumita K, Feng C, Xiong X, Shen H, Maruyama S, et al. (2001) Down-regulation of IL-12 p40 gene in Plasmodium berghei-infected mice. *J Immunol* **167**:235-241.
- Yamada J, Maruyama K, Sano Y, Kinoshita S, Murata Y, Hamuro J (2004) Promotion of corneal allograft survival by the induction of oxidative macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:448-454.
- Yet SF, Melo LG, Layne MD, Perrella MA (2002) Heme oxygenase 1 in regulation of inflammation and oxidative damage. *Methods in enzymology* **353**:163-176.
- Yin XJ, Ma JY, Antonini JM, Castranova V, Ma JK (2004) Roles of reactive oxygen species and heme oxygenase-1 in modulation of alveolar macrophage-mediated pulmonary immune responses to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles. *Toxicol Sci* **82**:143-153.
- Yoon C, Johnston SC, Tang J, Stahl M, Tobin JF, Somers WS (2000) Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *The EMBO journal* **19**:3530-3541.
- Zhang P, Martin M, Michalek SM, Katz J (2005) Role of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB in the regulation of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B. *Infection and immunity* **73**:3990-3998.

Zhang Y, Blattman JN, Kennedy NJ, Duong J, Nguyen T, Wang Y, et al. (2004) Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature* **430**:793-797.